



Diagnostik des pathogenen Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* mittels Bakteriophagen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Christin Marianne Uhlig
aus Frankfurt (Oder)

1. Referent: Privatdozent Dr.-Ing. Max Schobert
2. Referent: Professor Dr. Dieter Jahn
eingereicht am: 05.10.2016
mündliche Prüfung (Disputation) am: 05.12.2016

Druckjahr 2016

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Uhlig CM, Garbe J, Diekmann N, Peters S, Krause U., Schobert M.; Detection of live *Pseudomonas aeruginosa* cells using immobilized bacteriophages JG012 and JG024. (Poster) Phages 2014: Bacteriophage in Medicine, Food & Biotechnology, Oxford (2014).

Uhlig CM, Garbe J, Diekmann N, Peters S, Krause U, Rohde M, Schobert M.; Detection of live *Pseudomonas aeruginosa* cells using immobilized bacteriophages JG012 and JG024. (Poster) BioNanoMed 2015, Graz (2015).

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Glossar	8
1 Einleitung.....	10
1.1 Bakteriophagen	10
1.1.1 Diversität, Verbreitung und Nachweis von Phagen	13
1.1.2 Einfluss von Phagen auf ihre Umwelt	15
1.1.3 Phagen-Therapie	16
1.1.4 Nachweis von Bakterien mit Hilfe von Phagen	18
1.1.5 Unterscheidung lebender und toter Bakterien.....	20
1.1.6 Immobilisierung von Phagen.....	21
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
1.2.1 Problematik <i>P. aeruginosa</i> in der Industrie	23
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit	25
2 Materialien und Methoden	26
2.1 Materialien.....	26
2.1.1 Geräte.....	26
2.1.2 Chemikalien, Enzyme, Kits und Hilfsmittel.....	27
2.1.3 Medien	28
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	28
2.1.5 Verwendete Bakterienstämme und Phagen.....	28
2.2 Mikrobiologische Methoden.....	30
2.2.1 Sterilisation	30
2.2.2 Bakterienkultivierung.....	30
2.2.3 Lagerung von Bakterien.....	30
2.2.4 Bestimmung von Zelldichten.....	30
2.2.5 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (cfu)	31
2.2.6 Hitzeinaktivierung von <i>P. aeruginosa</i>	31

2.2.7	Vermehrung von Phagen	31
2.2.8	Aufreinigung von Phagen.....	31
2.2.9	Bestimmung des Phagentiters	32
2.2.10	Lagerung von Phagen	32
2.2.11	Elektronenmikroskopie	32
2.2.12	Bestimmung des Phagen-Rezeptors	32
2.2.13	Untersuchung der Wachstumseigenschaften von Phagen	32
2.2.14	Untersuchung des Infektionsverhaltens von immobilisierten Phagen im Vergleich zu freien Phagen	33
2.2.15	Überprüfung des Infektionsverhaltens der immobilisierten Phagen auf einem Filter	33
2.2.16	Wachstumsexperimente von immobilisierten Phagen zur Bestimmung der Ablöserate und des Endtiters	34
2.2.17	Phagen-Schnelltest zur Detektion von lebenden <i>P. aeruginosa</i> Bakterien.....	34
2.2.18	Artifizell verkeimte Kosmetikproben	34
2.3	Biochemische Methoden	35
2.3.1	Immobilisierung der Phagen an magnetische Nanopartikel	35
2.3.1.1	Immobilisierung der Phagen an Dynabeads® M-270 Epoxy	35
2.3.1.2	Immobilisierung der Phagen an Dynabeads® M-270 Carboxylic Acid	36
2.3.1.3	Immobilisierung der Phagen an Roti®-MagBeads COOH HP58.....	37
2.3.1.4	Immobilisierung der Phagen an Dynabeads® M-280 Streptavidin.....	38
2.3.2	Biotinylierung von Phagen	38
2.4	Molekularbiologische Methoden	39
2.4.1	Plasmid-DNA-Präparation.....	39

2.4.2	Isolierung genomischer Phagen-DNA.....	39
2.4.2.1	Probenvorbereitung.....	39
2.4.2.2	DNA-Aufreinigung	39
2.4.2.3	Protokoll zur Isolierung von Phagen-DNA	41
2.4.3	Elektrophoretische Auftrennung von DNA	41
2.4.4	Restriktion der DNA	42
2.4.5	Bestimmung der Phagen Genomstruktur: linear vs. zirkulär	42
2.4.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	42
2.4.7	Hybridisierung von Detektionssonden.....	44
2.4.8	Ligation von DNA.....	44
2.4.9	Transformation von <i>E. coli</i> CaCl ₂ -kompetenter Zellen	45
2.4.10	DNA-Sequenzierung.....	45
2.4.10.1	Sequenzierung von kurzen DNA-Abschnitten	45
2.4.10.2	Sequenzierung von Phagengenomen	46
2.5	Bioinformatische Methoden	46
2.5.1	Annotation von Phagengenomen.....	46
3	Ergebnisse und Diskussion.....	47
3.1	Entwicklung eines Diagnostik-Systems zum einfachen Nachweis von lebenden <i>P. aeruginosa</i> Bakterien basierend auf Phagen.....	47
3.1.1	Selektion von Phagen	50
3.1.2	Wirtsspektrum der Phagen JG012, JG054 und JG057	52
3.1.3	Bestimmung des Rezeptors zur Erkennung des Wirtes.....	54
3.1.4	Art der Nukleinsäure	55
3.1.5	Morphologie und Klassifizierung	58
3.1.6	Wachstumseigenschaften.....	59
3.1.7	Isolierung hochreiner Phagen-DNA	62
3.1.8	Bestimmung der Phagengenomstruktur.....	65

3.1.9	Genomsequenzierung und Annotation.....	67
3.1.9.1	<i>P. aeruginosa</i> Phagen JG012 und JG054	67
3.1.9.2	<i>P. aeruginosa</i> Phage JG057	79
3.1.10	Diagnostik von lebenden <i>P. aeruginosa</i> Bakterien mittels Phagen.....	85
3.1.11	Infektiosität von auf Nanopartikeln immobilisierten Phagen....	85
3.1.12	Infektion von <i>P. aeruginosa</i> in Proben durch Nanopartikel-immobilisierte Phagen auf einem Filter	94
3.1.13	Reduzierung der Ablöserate der Phagen von den Nanopartikeln	97
3.1.14	Dynabeads® M-280 Streptavidin.....	101
3.1.15	Detektion der Phagen mittels <i>Lateral Flow Dipstick</i> (LFD) Technologie.....	106
3.1.16	Etablierte Parameter des Diagnostik-Systems.....	107
3.1.17	Verifizierung des neu entwickelten Diagnostik-Systems an kontaminierter Kosmetik.....	109
4	Zusammenfassung	114
5	Ausblick.....	115
6	Abbildungsverzeichnis.....	116
7	Tabellenverzeichnis.....	118
8	Literaturverzeichnis.....	120
	Danksagung.....	130
	Anhang.....	131

Abkürzungen und Glossar

ad.	auffüllen auf
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CDS	kodierende Sequenzen (<i>coding sequences</i>)
CF	<i>cystic fibrosis</i> (Mukoviszidose)
cfu	<i>colony forming unit</i> (koloniebildende Einheit)
CsCl	Cäsiumchlorid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig (<i>double-stranded</i>)
dUTPase	Deoxyuridin 5'-Triphosphat Nukleotidohydrolase
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimid Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
GTP	Guanosintriphosphat
LCB	<i>local collinear blocks</i>
LFD	Lateral Flow Dipstick
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
Milli-Q H ₂ O	hochreines Wasser (aus Milli-Q®-System)
MOI	Multiplizität der Infektion (<i>multiplicity of infection</i>)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
pfu	Plaque-bildende Einheit (<i>plaque forming unit</i>)
PLG	Phase Lock Gel

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
ss	einzelsträngig (<i>single-stranded</i>)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
(v/v)	Volumenprozent (<i>volume per volume</i>)
(w/v)	Gewichtsprozent (<i>weight per volume</i>)
ü. N.	über Nacht
6-FAM	6-Carboxyfluorescein

1 Einleitung

1.1 Bakteriophagen

Bakteriophagen („Bakterien Fresser“), kurz Phagen wurden Anfang des 20. Jahrhunderts entdeckt. Frederick Twort beschrieb im Jahr 1915 die Lyse eines „Micrococcus“, wobei er „gläserne“ Kolonien beobachtete, die auf andere Kolonien übertragen werden konnten. Felix d’Herelle entdeckte zwei Jahre später eine Mikrobe, die sich „antagonistisch“ gegen Bakterien verhielt. Dies äußerte sich durch die vollständige Lyse von Flüssigkulturen und der Lyse von diskreten Bereichen auf Agaroberflächen (Plaques), die mit *Shigella* Kulturen bewachsen waren. Er beschrieb das Eindringen der unsichtbaren Mikroben in Bakterien sowie eine Vermehrung auf Kosten dieser, woraufhin er den Begriff Bakteriophage prägte. Während seines ganzen wissenschaftlichen Lebens beschäftigte er sich mit der Erforschung von Phagen und erkannte u.a. das Potenzial von Phagen für die Therapie von Infektionskrankheiten (Twort, 1915; D’Herelle, 1917).

Phagen sind Viren die ausschließlich Bakterien infizieren, wobei eine hohe Wirtsspezifität besteht. Das bedeutet, dass sie nur eine bestimmte Art von Bakterien infizieren können und einige sogar nur in der Lage sind einen bestimmten Stamm einer Art zu infizieren (Dorst *et al.*, 2010). Sie bestehen aus einzel- oder doppelsträngiger DNA bzw. RNA (ss - *single-stranded*, ds – *double-stranded*), die von Proteinen oder Lipiden umhüllt ist. Aufgrund dessen sind Phagen nicht in der Lage sich selbst zu replizieren, so dass sie zur Vermehrung und somit zur Verbreitung auf einen Wirt angewiesen sind (Ackermann, 2011). Die Erkennung des Wirtes durch die Phagen erfolgt über spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche, wie z. B. Lipopolysaccharide, Proteine der äußeren Membran, Flagellen, Pili, Peptidoglykan, Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren (Rakhuba *et al.*, 2010). Nach der Erkennung des Wirtes erfolgt die Injektion des Phagengenoms und die Vermehrung der Phagen im Wirt. Dabei können Phagen verschiedene Lebenszyklen durchlaufen: lytisch, lysogen, pseudolysogen und chronisch (siehe Abbildung 1). Bei Phagen, die den lytischen Lebenszyklus verfolgen, erfolgt direkt nach der Injektion der

Nukleinsäure die Replikation des Phagengenoms. Dabei manipuliert der Phage die wirtseigenen Prozesse der Transkription, Translation und Replikation hin zur Vermehrung des Phagengenoms und der Synthese von Phagenproteinen. Im Anschluss erfolgt die Assemblierung der neuen Phagenpartikel sowie die Freisetzung dieser durch die Lyse der Wirtszelle. Bei einer chronischen Infektion verläuft die Vermehrung der Phagen wie im lytischen Lebenszyklus. Jedoch werden die neugebildeten Phagen konstant durch Knospung oder Extrusion freigesetzt, wobei die Wirtszelle nicht lysiert wird.

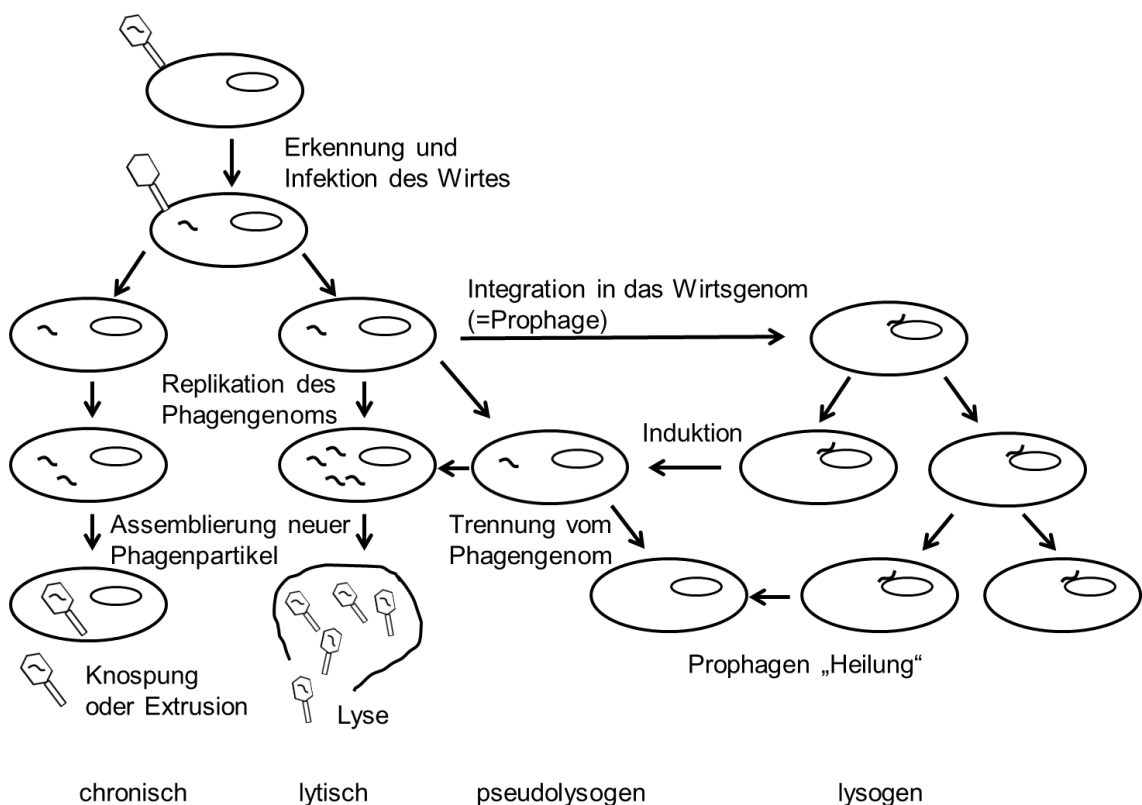


Abbildung 1: Arten der viralen Lebenszyklen (nach Weinbauer, 2004).

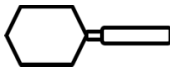
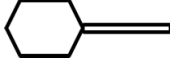
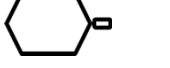








Phagen können dem lytischen, lysogenen, pseudolysogenen oder chronischen Lebenszyklus folgen. Nach der Erkennung des Wirtes über Rezeptoren, erfolgt beim lytischen und chronischen Verlauf die Injektion und Replikation des Erbgutes. Beim lytischen Verlauf erfolgt die Freisetzung aller neugebildeten Phagen durch Zelllyse und beim chronischen Verlauf werden die neugebildeten Phagen durch Knospung oder Extrusion kontinuierlich freigesetzt. Beim lysogenen Lebenszyklus wird das Genom in das Wirtsgenom integriert (= Prophage). Nach einer Vielzahl an Wirtsgenerationen kann der Prophage, durch die Aktivierung über spezifische Signale, in den lytischen Zyklus übergehen. Beim pseudolysogenen Zyklus wird weder das Phagengenom repliziert noch in das Wirtsgenom integriert. Es verharrt in einer Art Ruhezustand. Durch spezifische Signale (z. B. Aktivierung Wirtsmetabolismus) geht der Phage anschließend in den lytischen oder lysogenen Zyklus über.

Im Gegensatz dazu erfolgt bei lysogenen Phagen die Integration ihres Genoms in das Wirtsgenom oder es verbleibt als Plasmid in der Wirtszelle. Dieser Zustand (als Prophage) kann tausende Wirts-Generationen stabil bestehen, bis durch bestimmte Signale der Prophage in den lytischen Lebenszyklus übergeht und die Vermehrung induziert wird. Im pseudolysogenen Lebenszyklus hingegen wird weder das Phagengenom repliziert noch in das Wirtsgenom integriert. Es verharrt in einer Art Ruhezustand. Es wird vermutet, dass durch die Verlangsamung des Metabolismus der Bakterienzelle durch u.a. Nährstoffmangel, nicht genügend Energie für den lytischen oder lysogenen Lebenszyklus vorliegt. Erst wenn der Wirtsmetabolismus durch veränderte Umweltbedingungen aktiviert wird, geht der Phage vom Ruhezustand in einen der beiden genannten Lebenszyklen über (Ripp and Miller, 1997; Weinbauer, 2004).

Phagen werden basierend auf ihrer Nukleinsäure und Morphologie klassifiziert (siehe Tabelle 1). Hinsichtlich der Nukleinsäure wird unterteilt in Phagen die ss oder dsDNA bzw. RNA enthalten. Morphologisch betrachtet können Phagen eine polyedrische, filamentöse oder pleomorphe Form aufweisen oder einen zusätzlichen Schwanz besitzen. Phagen mit dsDNA und einer Kopf-Schwanz-Morphologie werden zu den *Caudovirales* zugeordnet und gehören mit ca. 96 % zu der größten Gruppe an Phagen. Sie besitzen einen ikosaedrischen Kopf und können anhand der Schwanz-Morphologie weiterhin in drei Familien unterteilt werden: *Myoviridae*, kontraktile Schwanz, *Siphoviridae*, langer nicht-kontraktile Schwanz und *Podoviridae*, kurzer Schwanz. Phagen ohne Schwanz, die eine polyedrische, filamentöse oder pleomorphe Form aufweisen, werden anhand detaillierter Unterschiede im Erbgut und der Kopfstruktur unterschieden und in sieben Familien eingeordnet (siehe Tabelle 1). Diese Familien sind sehr klein und machen nur einen geringen Anteil der klassifizierten Phagen aus (Ackermann, 2011).

Tabelle 1: Klassifizierung von Phagen (nach Ackermann, 2011).

Die Klassifizierung der Phagen erfolgt anhand ihrer Nukleinsäure und Morphologie. Dabei gibt es eine große Gruppe an Phagen, die *Caudovirales*, die eine Schwanz-Kopf-Morphologie besitzen und wurden anhand ihrer Schwanzlänge und -beschaffenheit weiter unterteilt in die Familien *Myoviridae*, *Siphoviridae* und *Podoviridae*. Die polyedrischen, filamentösen und pleomorphen Phagen machen den kleineren Anteil aus und werden durch detailliertere Unterschiede bezüglich der Nukleinsäure und Struktur in sieben Familien unterteilt. (z) zirkuläre Nukleinsäure; (l) lineare Nukleinsäure.

Form	Ordnung oder Familie	Nukleinsäure, Besonderheiten, Größe
	<i>Caudovirales</i>	dsDNA (l)
	<i>Myoviridae</i>	kontraktiler Schwanz
	<i>Siphoviridae</i>	langer nicht kontraktiler Schwanz
	<i>Podoviridae</i>	kurzer Schwanz
	<i>Microviridae</i>	ssDNA (z), 27 nm, 12 knopfähnliche Kapsomere
	<i>Corticoviridae</i>	dsDNA (z), komplexes Kapsid, Lipide, 63 nm
	<i>Tectiviridae</i>	dsDNA (z), inneres Lipidvesikel, Pseudoschwanz, 60 nm
	<i>Leviviridae</i>	ssRNA (l), 23 nm, ähnlich Poliovirus
	<i>Cystoviridae</i>	dsRNA (l), segmentiert, Lipidhülle, 70 – 80 nm
	<i>Inoviridae</i>	ssDNA (z), filamentös oder Stäbchen, 85 – 1950 x 7 nm
	<i>Plasmaviridae</i>	dsDNA (z), Lipidhülle, kein Kapsid, 80 nm

1.1.1 Diversität, Verbreitung und Nachweis von Phagen

In der Biosphäre stellen Phagen die quantitativ größte Gruppe innerhalb der Viren dar. Sie werden auf ca. 10^{31} geschätzt. Dabei wird davon ausgegangen, dass ca. zehn Phagen auf ein Bakterium kommen, von denen geschätzt 10^{30} auf der Erde existieren (Whitman *et al.*, 1998; Weinbauer and Rassoulzadegan, 2004; Ackermann, 2011; Rohwer and Barott, 2013). Diese Schätzungen

beziehen sich jedoch auf Untersuchungen des Meerwassers, wodurch die Anzahl der Phagen in anderen Milieus größer oder geringer ausfallen kann (Ashelford *et al.*, 1999). Phagen kommen überall z. B. in Ozeanen, in der Tiefsee, im Trinkwasser, im Boden und in Nahrungsmitteln vor. Damit treten sie ähnlich wie ihre Wirte ubiquitär auf und sind somit auch mit den Menschen und den Tieren assoziiert (Kutter and Sulakvelidze, 2005; Ackermann, 2011; Rohwer and Barott, 2013). Zur Untersuchung der Diversität und Verbreitung von Phagen in verschiedenen Habitaten können klassische und molekulare Methoden herangezogen werden. Phagen können mittels Epifluoreszenz-Mikroskopie oder Durchflusszytometrie quantifiziert werden (Brussard, 2009; Ortmann and Suttle, 2009). Morphologische Untersuchungen können mit Hilfe der Transmissions-Elektronenmikroskopie durchgeführt werden (Ackermann, 2009). Auf diese Weise kann ein Einblick in die Zusammensetzung und Verbreitung von Phagen-Populationen gewonnen werden. Wenn jedoch detailliertere Untersuchungen einzelner Phagen vorgenommen werden sollen müssen diese zunächst mittels des spezifischen Bakterienstammes isoliert und propagiert werden. Dazu werden unter Laborbedingungen die Phagen mit einem spezifischen Bakterienstamm inkubiert. Dabei kommt es nur zur Vermehrung der Phagen, diese den Bakterienstamm über spezifische Rezeptoren erkennen und infizieren können. Über Plaqueassays werden die einzelnen Phagen anhand der Plaquemorphologie isoliert und aufgereinigt (Millard, 2009). Aufgrund des Fortschritts der Sequenzierungstechnologie und der Kostenreduktion sind Metagenomanalysen eine weitere Möglichkeit Phagen bezüglich der Diversität und des Vorkommens zu charakterisieren. Dazu kann das gesamte genetische Phagenmaterial eines bestimmten Standorts gesammelt und untersucht werden, ohne dass die Phagen isoliert werden müssen. Dadurch ist es ebenfalls möglich, nicht-kultivierbare Phagen zu erforschen. Die bis dato sequenzierten und annotierten Phagen zeigen eine hohe Genomdiversität sowie eine Vielzahl an unbekannten bzw. hypothetischen Genen. Das erschwert eine Auswertung der Daten der Metagenomanalysen (Clokier *et al.*, 2011). Aufgrund dessen ist eine detaillierte Sequenzierung und Annotation von einzeln isolierten Phagen-genomen sowie die

Funktionsaufklärung einzelner Gene unerlässlich, um die Grundlagen für die Analyse von Phagen-Populationen zu liefern.

1.1.2 Einfluss von Phagen auf ihre Umwelt

Phagen haben eine Schlüsselrolle in der Regulierung der mikrobiellen Balance und üben einen großen Einfluss auf die Umwelt aus (Weinbauer and Rassoulzadegan, 2004; Abedon, 2008). Phagen infizieren und lysieren eine Vielzahl an Bakterien und erhöhen dadurch die mikrobielle Diversität und Produktivität des Ökosystems. Die stetige Lyse von Bakterien beeinflusst zum einen die Zusammensetzung von Populationen und ökologischen Nischen, so dass diese von anderen Bakterien besetzt werden können. Zum anderen führen Mutationen, die eine Infektion von Phagen verhindern, zu einer größeren Diversität von Bakterien. Durch die Lyse der Bakterien werden Zellbestandteile und Nährstoffe freigesetzt, die von anderen Mikroorganismen verwertet werden können. Auf diese Weise üben Phagen einen großen Einfluss auf die Energie- und Nährstoffkreisläufe der Natur aus (Fuhrman, 1999; Weinbauer and Rassoulzadegan, 2004; Rohwer and Barott, 2013). Phagen können den Austausch von genetischem Material zwischen Bakterien beeinflussen durch horizontalen Gentransfer. Dies geschieht mittels Transduktion, wobei Phagen als Vektoren zur Übertragung von bakterieller DNA genutzt werden. Während der Phagenvermehrung kann es vorkommen, dass anstelle der Phagen-DNA Fragmente der Wirts-DNA in die Phagenköpfe verpackt werden. Auf diese Weise gelangt nach der Infektion neuer Wirte bakterielle DNA in ein anderes Bakterium. Weiterhin können Phagen Träger bakterieller DNA werden in dem Prophagen nach ihrer Aktivierung nicht korrekt aus dem Genom geschnitten und vermehrt werden und dabei Wirts-DNA mitnehmen. So können morphologische, metabolische oder immunogene Eigenschaften vom Phagen übertragen werden. Dadurch kann die Fitness der Bakterien erhöht werden, wodurch die Strukturierung als auch die Diversität einer Bakteriengemeinschaft beeinflusst werden kann (Edlin *et al.*, 1975; Weinbauer and Rassoulzadegan, 2004). Es gibt Bakterien, die nur durch die Anwesenheit von Prophagen Toxine produzieren und somit ihre Pathogenität steigern, wie z. B. *Corynebacterium*

diphtheriae (Diphtherie), *Clostridium botulinum* (Botulismus), *Vibrio cholerae* (Cholera) und *Staphylococcus aureus* (Lebensmittelvergiftung) (Waldor and Mekalanos, 1996; Brüssow *et al.*, 2004). Genomanalysen zeigten, dass die meisten Bakterien lysogene Phagen tragen. Somit spielen Phagen eine wichtige Rolle in der Evolution der Wirtsgenome (Brüssow and Hendrix, 2002; Lawrence *et al.*, 2002; Brüssow *et al.*, 2004).

1.1.3 Phagen-Therapie

Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts erkannte d'Herelle das Potential der Phagen zur Bekämpfung von pathogenen Erregern. Phagen infizieren spezifisch Bakterien und sind nicht toxisch für Tiere und Pflanzen. Zudem kommt es direkt am Ort der Infektion zu einer Erhöhung des Phagentiters aufgrund der spezifischen Infektion des Erregers und der daraus resultierenden Vermehrung (Summers, 2001). Im Jahr 1919 behandelte d'Herelle erfolgreich eine bakterielle Dysenterie am Menschen, durch die orale Verabreichung einer Anti-Dysenterie Phagen Präparation (D'Herelle, 1917; Summers, 2001; Kutter and Sulakvelidze, 2005). Bruynoghe und Maisin behandelten drei Jahre später erfolgreich eine *Staphylococcus*-Infektion der Haut bei sechs Patienten (Kutter and Sulakvelidze, 2005). Trotz dieser und weiterer erfolgreicher Behandlungen von Krankheiten mittels Phagen, kam es Mitte des 20. Jahrhunderts zu einem Abbruch der Phagen-Forschung. Aufgrund der Entdeckung von Antibiotika und die mit ihnen verbundenen Vorteile gegenüber Phagen (einfache Produktion, relativ breite Wirksamkeit) blieben die erforderlichen Forschungen auf dem Gebiet der Phagen-Therapie aus. Lediglich einige Länder in der ehemaligen Sowjetunion verwendeten und erforschten Phagen weiterhin, wie dem Eliava Institute of Bacteriophage in Georgien (Barrow and Soothill, 1997; Summers, 2001).

Weltweit konnte in den letzten Jahren das Auftreten von pathogenen Bakterien, die gegenüber einer Vielzahl an Antibiotika resistent sind, beobachtet werden. Zu den Bakterien, die häufig Multiresistenzen aufweisen zählen u.a. der Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA), Vancomycin-resistente Enterokokken und multiresistente *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme. Diese Bakterien

können schwere Krankheitsverläufe verursachen, die nur schwer oder gar nicht mit Antibiotika therapierbar sind. Jährlich sterben in Europa ca. 25.000 Patienten an den Folgen solcher Erkrankungen (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) and (EMA), 2009). Jedoch stellt diese Problematik auch enorme Mehrkosten für das Gesundheitswesen dar sowie Produktionsausfälle durch die Abwesenheit der Arbeitnehmer aufgrund von Krankheit. Diese Kosten werden in Europa auf ca. 1,5 Milliarden Euro pro Jahr geschätzt (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) and (EMA), 2009). Aufgrund dieser kritischen aktuellen Lage gewinnen alternative Behandlungsmöglichkeiten, wie die Phagen-Therapie immer mehr an Bedeutung (Golkar *et al.*, 2014). Ein Vorteil von Phagen gegenüber Antibiotika besteht in der hohen Wirtsspezifität. Phagen infizieren nur den pathogenen Keim. Im Gegensatz dazu wirken Antibiotika nicht nur gegen den pathogenen Keim, sondern beispielsweise auch gegen die gesamte intestinale Flora, was eine Sekundärinfektion mit anderen Pathogenen und damit einen schweren Krankheitsverlauf zur Folge haben kann (Merril *et al.*, 2003). Phagen replizieren sich selbst am Ort der Infektion, wo eine erhöhte Konzentration zur Bekämpfung des Pathogens erforderlich ist. Folglich müssen Phagenpräparate nur einmalig verabreicht werden. Für therapeutische Zwecke geeignete spezifische Phagen können direkt aus der Umwelt isoliert und hochrein aufgereinigt werden. Dies kann wenige Tage bis Wochen dauern. Bakterien können ebenfalls Resistenzen gegenüber Phagen bilden. Dabei können u.a. Modifizierungen an den Rezeptoren ein Anheften der Phagen verhindern und schlussfolgernd eine Infektion. Allerdings besitzen Phagen eine hohe Mutationsrate und können somit der Resistenz entgegenwirken (Drake *et al.*, 1998). Zudem kann der Resistenz gegenüber Phagen durch den Einsatz von Phagen-Cocktails umgangen werden (Brüssow, 2012; Pirnay *et al.*, 2012; Golkar *et al.*, 2014). Dabei können verschiedene Phagen eingesetzt werden, die denselben Wirt über verschiedene Rezeptoren infizieren. Trotz der vielen Vorteile und erfolgreichen Anwendungen müssen noch Untersuchungen bezüglich der Applikation, des Verhaltens sowie Abbaus im menschlichen Körper und mögliche Reaktionen des Immunsystems vorgenommen werden. Weiterhin müssen detaillierte Charakterisierungen der Phagen bezüglich ihrer

Biologie und genetischen Zusammensetzung erfolgen, um mögliche Nebenreaktionen durch den Einsatz der Phagen zu vermeiden. So müssen Gene ausfindig gemacht werden, die z. B. für Toxine kodieren. Erst dann wäre eine Zulassung der Phagen-Therapie möglich (Merril *et al.*, 2003). Neben der Verwendung der Phagen als Ganzes können auch Teile von Phagen zur Bekämpfung von Bakterien genutzt werden, wie z. B. Endolysine. Hierbei handelt es sich um Phagen-kodierte Enzyme, die die bakterielle Peptidoglykanschicht am Ende der Phagen Replikation aufbrechen (Loessner, 2005). Es können auch Holine verwendet werden, die die bakterielle Zellmembran aufschließen (Merril *et al.*, 2003). Es konnten Polypeptide von Phagen identifiziert werden, die mit Enzymen der Zellmembranbiosynthese interferieren und somit die Lyse des Bakteriums bedingen (Bernhardt *et al.*, 2001). Die zunehmende Verbreitung von multiresistenten Bakterien und den damit verbundenen Komplikationen bei der Behandlung verdeutlichen die Notwendigkeit von neuen therapeutischen Ansätzen. Die Verwendung von Phagen oder einzelnen Phagenkomponenten stellt hierbei eine vielsprechende Alternative bei der Therapie von durch multiresistente Bakterien verursachten Krankheiten dar.

1.1.4 Nachweis von Bakterien mit Hilfe von Phagen

Konventionelle Methoden zur Identifizierung von Bakterien, wie beispielsweise deren Kultivierung, sind zeitaufwendig. Es können so auch nur kultivierbare Bakterien nachgewiesen werden. Neu entwickelte Methoden wie biochemische Detektionssysteme, die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Immunoassays und Gaschromatographie kombiniert mit Massenspektrometrie basierten Nachweisen zeichnen sich durch eine hohe Selektivität und Sensitivität aus. Im Vergleich zu den konventionellen Methoden sind sie schwieriger in der Anwendung, benötigen spezialisiertes Personal, spezifische Technik und sind aufgrund der zum Teil hohen Anschaffungs- und Unterhaltungskosten nur für den Gebrauch in größeren diagnostischen Analyse Laboratorien geeignet (Dorst *et al.*, 2010; Smietana *et al.*, 2011). Schlussfolgernd werden Nachweissysteme benötigt, die sich zum einen durch eine hohe Sensitivität und

Selektivität auszeichnen. Zum anderen sollen sie einfach in der Anwendung sein, schnell Ergebnisse produzieren, dabei kosteneffektiv und portabel sein. Diese Eigenschaften können von auf Phagen basierten Nachweismethoden erfüllt werden. Durch die lytische Infektion von Bakterien und der resultierenden Vermehrung innerhalb weniger Stunden sind Phagen schnell und kosteneffektiv herstellbar (Dorst *et al.*, 2010). Sie sind stabil unter einer Vielzahl an Bedingungen und weisen eine hohe Wirtsspezifität auf, wodurch nur die pathogenen Erreger lysiert werden (Brigati and Petrenko, 2005; Verma *et al.*, 2009). Aufgrund dessen sind Phagen hervorragend zur Detektion von Bakterien geeignet. Die klassische Methode zum Nachweis von Bakterien ist der Plaqueassay, wobei Phagensuspensionen auf einen Bakterienrasen gegeben werden. Dabei infizieren die Phagen die Bakterien, die zur Freisetzung neugebildeter Phagen lysiert werden. Auf einem Bakterienrasen kann in diesem Bereich nach der Inkubationszeit von ca. 24 h eine Zone lysierter Bakterien (= sogenannte Plaques) beobachtet werden. Aufgrund der Einfachheit und hohen Reproduzierbarkeit wird dieses Testsystem auch zur Typisierung von pathogenen Bakterien genutzt (Rabsch *et al.*, 2004; Cox *et al.*, 2015). Weitere Methoden basieren auf dem direkten Nachweis von Phagen, nachdem sie das Ziel-Bakterium gebunden haben. Dabei kann die Detektion durch Messung von Fluoreszenzstrahlung (Goodridge *et al.*, 1999a; b), Resonanzänderung (Balasubramanian *et al.*, 2007; Nanduri *et al.*, 2007) oder Massenänderung (Olsen *et al.*, 2006; Cerruti *et al.*, 2009) erfolgen. Weiterhin können Phagen zur Lyse der Bakterien verwendet werden, wobei zu detektierende zelluläre Komponenten freigesetzt werden. Rekombinante Phagen können Reportergene in die bakterielle Zelle einbringen, die für die zu detektierenden Substanzen kodieren. Der Nachweis kann dabei mittels Biolumineszenz oder elektrochemischer Sensoren erfolgen (Loessner *et al.*, 1997; Sanders, 1999; Schuch *et al.*, 2002; Neufeld *et al.*, 2003, 2005; Birmele *et al.*, 2008; Ripp *et al.*, 2008).

1.1.5 Unterscheidung lebender und toter Bakterien

Die klassische Methode zum quantitativen Nachweis von lebenden Bakterien ist die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (cfu, *colony forming unit*). Jedoch können auf diese Weise nur kultivierbare Bakterien untersucht werden. Zudem benötigt diese Methode, abhängig vom Bakterium, eine lange Inkubationszeit (Breeuwer and Abee, 2000). Alternative Möglichkeiten sind Mikroskopie, Durchflusszytometrie und PCR. Für die Mikroskopie und Durchflusszytometrie werden fluoreszierende Reagenzien verwendet, die eine Unterscheidung von toten und lebenden Zellen, aufgrund einer veränderten Membrangängigkeit dieser Substanzen zwischen lebenden und toten Zellen, ermöglichen (Boulos *et al.*, 1999; Fernandes *et al.*, 2014). Weiterhin werden Redox-Sonden, wie Tetrazoliumsalze, die in der Elektronentransferkette reduziert werden, Membranpotential-Sonden (anionische Oxonol-Farbstoffe) und Esterase Substrate (Fluorescein-Diacetat) eingesetzt. Bei diesen Sonden handelt es sich um nicht fluoreszierende Vorstufen, die von der Zelle aufgenommen und in fluoreszierende und positiv geladene Produkte umgewandelt werden. Aufgrund der positiven Ladung verbleiben die Produkte in der Zelle und weisen somit auf eine intakte Membran hin. Somit kann mit diesen Nachweissystemen eine lebende Zelle indirekt durch aktive Enzyme oder eine intakte Membran nachgewiesen werden (Bunthof *et al.*, 2001). PCR-basierte Methoden können ebenfalls angewendet werden. Dabei kann mittels Reverser-Transkriptase-PCR mRNA nachgewiesen werden, die ein direkter Indikator für den aktiven bakteriellen Metabolismus ist (Morin *et al.*, 2004). Jedoch ist RNA sehr instabil und kann während der Bearbeitung der Proben durch die ubiquitär vorkommenden Nukleasen degradiert werden. Dies kann zu falsch-negativen Ergebnissen führen (Elizaquível *et al.*, 2013). Eine weitere Möglichkeit ist die Detektion von DNA mittels *viability* PCR, wobei PCR- oder quantitative Echtzeit-PCR-Methoden mit DNA interkalierenden Substanzen, wie z. B. Propidium Monoazid oder Ethidium Monoazid, gekoppelt werden. Dabei gelangen diese Substanzen nur in Zellen mit einer beschädigten Zellmembran und interkalieren anschließend kovalent in die DNA durch ihre Aktivierung mittels einer starken Belichtung. In Folge kommt es zur Inhibierung der DNA-Amplifizierung mittels PCR, wodurch die DNA von toten Zellen nicht mehr

nachgewiesen werden kann (Nogva *et al.*, 2003; Nocker *et al.*, 2006). Jedoch konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene technische Aspekte einen Einfluss auf den erfolgreichen Einsatz dieser interkalierenden Substanzen haben, wie die Art des Mikroorganismus, die Konzentration der Substanz, die Konzentration an lebenden und toten Bakterien, die Länge des PCR-Produkts, der pH-Wert, die Salzkonzentration der Probe und die Lichtquelle (Fittipaldi *et al.*, 2012). Aufgrund dessen muss eine Anwendung dieser interkalierenden Reagenzien für jeden Mikroorganismus und der jeweiligen Zusammensetzung der zu untersuchenden Probe optimiert werden, so dass eine kommerzielle Anwendung erschwert wird. Im Vergleich zu den beschriebenen Methoden sind Phagen zum Nachweis lebender Zellen besonders gut geeignet. Phagen werden ausschließlich in lebenden Zellen mit einem aktiven Metabolismus vermehrt, so dass eindeutige Ergebnisse erzielt werden (Smartt and Ripp, 2011; Fernandes *et al.*, 2014).

1.1.6 Immobilisierung von Phagen

Der Vorteil von immobilisierten Phagen an einer Oberfläche besteht in der besseren Kontrolle ihrer Anwendung für den Einsatz zur Detektion oder zur Eliminierung von Bakterien. Dabei gibt es verschiedene Methoden zur Immobilisierung von Phagen. Bei der einfachen und zugleich sehr effizienten physikalischen Adsorption basiert die Bindung von Phagen an eine Oberfläche auf hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Proteinmolekülen des Phagen und der Substratoberfläche (Nanduri *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2009). Oft werden Silica-Oberflächen verwendet, die sich mit verschiedenen Substanzen modifizieren lassen, um eine anionische oder kationische Oberfläche zu erhalten (Cademartiri *et al.*, 2010). Die Bindung an diese Oberflächen erfolgt aufgrund der inhärenten Ladungscharakteristika der Phagenhülle. Phagen besitzen einen negativ geladenen Kopf und einen positiv geladenen Schwanz. Aufgrund dessen erfolgt die Bindung an der anionischen Oberfläche über den Schwanz und an der kationischen Oberfläche über den Kopf. Bei letzterem bleiben die Schwanzfasern frei und behalten die Fähigkeit der Infektion. Durch diese Modifizierung ist eine gerichtete Immobilisierung

möglich. Weiterhin ist eine physikalische Adsorption an Goldoberflächen möglich. Singh *et al.* (2009) konnten durch die Modifizierung der Goldoberfläche mit Aminosäuren und Zuckerresten eine Erhöhung der Adsorption zeigen. Die Zuckerreste und Aminosäuren enthalten verschiedene terminale Gruppen, mit denen die Phagen Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können. Dadurch entsteht eine chemische Verankerung der Phagen auf der Oberfläche. Des Weiteren können Aminosäuren wie Histidin, Cystein und Cysteamin verwendet werden. Über deren funktionelle Thiolgruppen erfolgen die Bindungen an das Goldsubstrat und an die Phagen. Durch Quervernetzen (*crosslinking*) mit Glutaraldehyd kann die Bindung der Phagen sogar gesteigert werden (Singh *et al.*, 2009). Eine weitere Möglichkeit der chemischen Immobilisierung ist die Verwendung eines molekularen Films aus biotinylierten Phospholipiden auf einer Goldoberfläche mittels Langmuir-Blodgett-Technik. Dabei erfolgt die Bindung der Phagen über Streptavidin an die biotinylierten Phospholipide (Nanduri *et al.*, 2007). Durch die genetische Modifizierung der Phagenköpfe, wie der Expression von Biotin-bindenden Proteinen auf der Capsidhülle, kann die Bindung an Streptavidin optimiert werden und wesentlich zielgerichteter erfolgen (Gervais *et al.*, 2007). Ebenso ist es möglich Phagen an magnetischen Nanopartikeln zu immobilisieren. Durch die magnetischen Eigenschaften von magnetischen Nanopartikeln können diese einfach und effektiv aus einem Gemisch separiert werden. Auf diese Weise können Bakterien einfach und schnell separiert und aufkonzentriert werden (Saiyed *et al.*, 2003; Shabani *et al.*, 2013).

1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa ist ein Gram-negatives, fakultativ anaerobes, polar begeißeltes Stäbchen. Es kommt ubiquitär im Wasser und Boden vor und kann bei Pflanzen, Tieren und Menschen akute und chronische Infektionen auslösen (Diaz *et al.*, 2011; Franklin *et al.*, 2011). *P. aeruginosa* besitzt eine breite metabolische Kapazität und kann eine Vielzahl an Kohlenstoff- und Energiequellen nutzen, d.h. organische Verbindungen wie Fettsäuren, Zucker, Di- und Tricarbonsäuren, Alkohole, Glykole, Aromaten, Amine und

Aminosäuren (Frimmersdorf *et al.*, 2010). Zudem kann es sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen Stoffwechsel betreiben (Zumft, 1997; Eschbach *et al.*, 2004; Arai, 2011). Aufgrund dessen ist es *P. aeruginosa* möglich sich an extreme Umweltbedingungen und eine Vielzahl ökologischer Nischen anzupassen (Kiewitz and Tümmler, 2000). Als opportunistisches Pathogen verursacht es insbesondere bei immungeschwächten Patienten Infektionen des Respirationstraktes, des Urogenitaltraktes und von Wunden. Patienten mit Mukoviszidose (CF, *cystic fibrosis*) sind vor allem von chronischen Infektionen der Lunge betroffen (Salunkhe *et al.*, 2005; Hirsch and Tam, 2010). *P. aeruginosa* ist einer der häufigsten Erreger nosokomialer Infektionen und stellt aufgrund seiner hohen Anpassungsfähigkeit ein großes Problem in der Krankenhaushygiene dar. Aufgrund seiner hohen intrinsischen Resistenz gegenüber einer Vielzahl an Antibiotika und seiner Fähigkeit rasch neue Resistenzen zu entwickeln, ist die Behandlung von durch *P. aeruginosa* ausgelösten Infektionen problematisch. Außerdem besitzt dieser Krankheitserreger zahlreiche zellgebundene und extrazelluläre Virulenzfaktoren, welche die Pathogenität beeinflussen (Sadikot *et al.*, 2005; Hirsch and Tam, 2010; Sharma *et al.*, 2011). Diese Fakten machen deutlich wie wichtig die Erforschung neuer Strategien zur Bekämpfung von *P. aeruginosa* sind, um auftretende Infektionen erfolgreich zu behandeln.

1.2.1 Problematik *P. aeruginosa* in der Industrie

Aufgrund seiner metabolischen Vielfalt stellt *P. aeruginosa* nicht nur in der Krankenhaushygiene, sondern auch in der Lebensmittel-, Kosmetik- und pharmazeutischen Industrie ein Problem dar. Die Verunreinigung von pharmazeutischen Produkten kann schwere gesundheitliche Folgen für den Verbraucher haben. In diesem Zusammenhang sind Fälle beschrieben, in denen pharmazeutische Produkte mit Pathogenen kontaminiert waren. Es wurden beispielsweise *Salmonella* Infektionen durch kontaminierte Schilddrüsentabletten (Ragheb *et al.*, 2012) oder *P. aeruginosa* Infektionen durch kontaminierte Mundschwämme für die Mundhygiene ausgelöst (Iversen *et al.*, 2007). Es gibt Berichte von Infektionen und einem Todesfall aufgrund von

mit *P. aeruginosa* kontaminiertem Shampoo bei immunsupprimierten Patienten, als auch mehrere Fälle von Augeninfektionen bis zum Sehverlust durch kontaminierte kosmetische Produkte (Tan *et al.*, 2013). Durch kontaminierte Lebensmittel übertragene Krankheiten sind weltweit jährlich für über 20 Millionen Todesfälle verantwortlich (Mungroo *et al.*, 2015). In den USA sind jährlich 51.000 Fälle von *P. aeruginosa* Infektionen bekannt, die von Lebensmittelkontaminationen ausgehen und davon wurden 13 % von multiresistenten Stämmen ausgelöst (Mungroo *et al.*, 2015). Kosmetische Produkte müssen nicht steril sein, aber frei von pathogenen Organismen (wie *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*). Außerdem darf der Anteil an Mikroorganismen nur sehr gering sein (Tan *et al.*, 2013). In dem Europäischen Arzneibuch sind die festgelegten Akzeptanzkriterien für die mikrobiologische Qualität von nicht sterilen pharmazeutischen Zubereitungen aufgelistet. Dabei dürfen Darreichungsformen, die eine kutane Anwendung oder eine Anwendung in der Mundhöhle, am Zahnfleisch, in der Nase oder am Ohr finden eine cfu/mL von 10^2 an aeroben Mikroorganismen und eine cfu/mL von 10^1 an Hefen und Schimmelpilzen nicht überschreiten. Zudem dürfen in diesem Fall in 1 mL oder 1 g der Darreichungsform keine *P. aeruginosa* und *S. aureus* Bakterien auftreten (*Europäisches Arzneibuch; 8. Ausgabe; Grundwerk 2014 inkl. 1. - 6. Nachtrag*, 2014). Andernfalls besteht die Gefahr des Verderbs des Produkts wie auch eine Gefahr für die Gesundheit des Verbrauchers (Behravan *et al.*, 2005; Campana *et al.*, 2006). Entsprechend unterliegen die verschiedenen Industriebranchen strengen Auflagen bezüglich der Produktionshygiene und des Hygienemonitorings. In Folge dessen schnelle, zuverlässige sowie einfach zu bedienende Nachweismethoden unerlässlich sind um eindeutige Ergebnisse bezüglich einer Kontamination zu erhalten und schwere resultierende Infektionen zu verhindern. Zudem bringen schnelle und einfach zu bedienende Methoden den Vorteil einer Überprüfung der Hygiene während der Produktion, so dass Produktionsausfälle oder große Unterbrechungen vermieden bzw. verringert und auftretende Verluste gering gehalten werden können.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Klassische Methoden zum Nachweis von Bakterien sind sehr zeitaufwendig, können nur bedingt zwischen toten und lebenden Zellen unterscheiden, benötigen geschultes Personal oder setzen teure technische Geräte voraus. Aufgrund dessen sollte in dieser Arbeit ein einfaches und zuverlässiges Diagnostik-System zum Nachweis von lebenden *P. aeruginosa* Bakterien entwickelt werden. Dies sollte unter einfachsten Bedingungen und von Personen ohne molekularbiologische Kenntnisse durchführbar sein. Der Nachweis sollte indirekt über *P. aeruginosa*-spezifische Phagen erfolgen. Dazu sollte zuerst nach geeigneten Phagen gescreent werden, die im Anschluss näher charakterisiert, sequenziert und annotiert werden sollten. Abschließend sollte der Nachweis der freigesetzten Phagen in Zusammenarbeit mit der Firma AMODIA Bioservice GmbH mittels Lateral-Flow Streifen entwickelt werden. Zur besseren Anwendung und der Unterscheidung der neugebildeten Phagen von den zur Infektion eingesetzten Phagen, sollten diese an Nanopartikel immobilisiert und die Infektiosität überprüft werden. Abschließend sollte der neu entwickelte Test an einem Produkt der Kosmetikindustrie angewendet werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

In der Tabelle 2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte aufgeführt.

Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte.

Gerät	Modell	Hersteller, Firmensitz
Agarosegelelektrophorese	Agagel	Biometra, Göttingen, Deutschland
Agarosegel-Dokumentation	UV Transilluminator	Wealtec, Sparks, USA
	De-Vision DBox	DC Science Tec, Ontario, Kanada
Autoklav	EL8350	Systec, Wetzlar, Deutschland
Mehrkanalpipette	Transferpipette®	Brand, Wertheim, Deutschland
Mikroskop	Axioskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Neubauer	Hecht-Assistent, Sondheim/Rhön, Deutschland
pH-Messgerät	pH211 Microprocessor	Hanna Instruments, Kehl, Deutschland
Photometer	Biomate 3	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
	Nanodrop ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Pipetten	Reference	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reinstwasseranlage	Milli-Q System	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Sicherheitswerkbank Schüttler	HeraSafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
	TR 150; TR 125	Infors GmbH, Einsbach, Deutschland
Thermocycler Thermoschüttler	C1000™ Thermal Cycler	Biorad, München, Deutschland
	Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Waagen	Feinwaage Kern, ALJ 160-4NM	Kern & Sohn GmbH, Ballingen, Deutschland
	Kern 572	Kern & Sohn GmbH, Ballingen, Deutschland
Zentrifugen	Megafuge 1-0 R	Heraeus, Hanau, Deutschland
	Mini Spin	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Avanti J-E Centrifuge	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Zentrifugenrotoren	Optima™ L-90K Ultracentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
	JA-14	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
	JLA-9.1000	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
	SW40Ti	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland

2.1.2 Chemikalien, Enzyme, Kits und Hilfsmittel

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Enzyme, Kits und Hilfsmittel sind in der Tabelle 3 aufgelistet. Die hier nicht separat aufgelisteten Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, Merck, Riedel-de Haën, Roth oder Sigma mit dem höchst möglichen Reinheitsgrad bezogen. Spezielle Puffer und Lösungen, die nur für bestimmte Experimente verwendet wurden, sind in den jeweiligen Kapiteln separat aufgeführt.

Tabelle 3: Auflistung der eingesetzten Chemikalien, Enzyme, Kits und Hilfsmittel.

Produkt	Hersteller, Firmensitz
Biotine: EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin (21217) D-Biotin Succinimidyl Ester (B1513) Sulfo-NHS-LC-Biotin (B6353) Biotin Ethylendiamin (A1593) Nα-(3-maleimidylpropionyl)biocytin (M1602)	Thermo Fisher Scientific. Schwerte, Deutschland
Chromatographie Puffer 01, LFD (ADL-B01)	AMODIA Bioservice GmbH, Braunschweig, Deutschland
CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific. Schwerte, Deutschland
DNA-Ladepuffer (6-fach)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
DNase I	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DNeasy® Blood & Tissue Kit von Qiagen	Qiagen, Hilden, Deutschland
Dynabeads® M-270 Carboxylic Acid	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Dynabeads® M-270 Epoxy	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Dynabeads® M-280 Streptavidin	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Exonuklease <i>Bal31</i>	New England Biolabs, Frankfurt a. Main, Deutschland
Größenstandard für Agarosegele GeneRuler™ DNA Ladder Mix GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Lysisreagenz (ADL-LR01)	AMODIA Bioservice GmbH, Braunschweig, Deutschland
Neutralisierungspuffer (ADL-NB01)	AMODIA Bioservice GmbH, Braunschweig, Deutschland
Phase Lock Gel Light 15 mL	5 Prime, Hamburg, Deutschland
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt a. Main, Deutschland
Proteinase K	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt a. Main, Deutschland
RNase A	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Roti®-MagBeads COOH HP58	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Slide-A-Lyzer™ G2 Dialysis Cassettes, 3.5K MWCO, 3 mL	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Sterilfilter: 0,2 µm Porengröße	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
T4 Ligase	New England Biolabs, Frankfurt a. Main, Deutschland
Taq-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt a. Main, Deutschland
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.3 Medien

Die angegebenen Medien wurden mit deionisiertem Wasser aufgefüllt und anschließend zur Sterilisation autoklaviert.

CASO-Bouillon	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
CASO-Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Topagar	CASO-Agar : SM-Puffer (Verhältnis 1:1)

2.1.4 Puffer und Lösungen

Häufig verwendete Puffer und Lösungen:

SM-Puffer	100,0 mM NaCl 8,0 mM MgSO ₄ 50,0 mM Tris-HCl, pH 7,5
TM-Puffer	10,0 mM Tris-HCl, pH 7,5 100,0 mM NaCl 10,0 mM MgCl ₂
PBS-Puffer	137,0 mM NaCl 2,7 mM KCl 10,0 mM Na ₂ HPO ₄ 2,0 mM KH ₂ PO ₄
TAE-Puffer	40,0 mM Tris-Acetat 1,0 mM EDTA pH 8,0

2.1.5 Verwendete Bakterienstämme und Phagen

Die verwendeten Phagen sind in der Tabelle 4 und die Bakterienstämme in der Tabelle 5 und Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Phagen.

*Diese Phagen wurden von Dr. Julia Garbe isoliert und in Anfängen charakterisiert (Julia Garbe, unveröffentlicht).

Phage	Beschreibung	Referenz/Quelle
JG004	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 Phage	Garbe <i>et al.</i> 2011
JG024	<i>P. aeruginosa</i> PA14 Phage	Garbe <i>et al.</i> 2010
JG012*, JG018*, JG025*, JG026*, JG027*, JG042*, JG043*, JG045*, JG047*, JG048*, JG050*, JG051*, JG054*, JG057*, JG058*, JG059*	<i>P. aeruginosa</i> PA14 Phagen	Julia Garbe, unveröffentlicht

Tabelle 5: Verwendete *P. aeruginosa*-Stämme.

* Diese Stämme wurden von Nadine Koch übernommen (Nadine Koch, unveröffentlicht).

<i>P. aeruginosa</i> -Stämme	Beschreibung	Referenz/Quelle
PAO1	Wildtyp	Holloway <i>et al.</i> 1979
PAO1 DK	Wildtyp	Klausen <i>et al.</i> 2003
PAO1 DK <i>pilA</i>	PAO1 DK $\Delta pilA$	Klausen <i>et al.</i> 2003
UCBPP-PA14	Wildtyp	Rahme <i>et al.</i> 1995
PA14_60260 *	PA14_60260::MAR2xT7, marines Transposon integriert in Gen des Regulators PilR (<i>pilR</i>)	Liberati <i>et al.</i> 2006
PA14_66660 *	PA14_66660::MAR2xT7, marines Transposon integriert in Gen des Typ- IV-Pili Biogeneseproteins PilM (<i>pilM</i>)	
PA14_66620 *	PA14_66620::MAR2xT7, marines Transposon integriert in Gen des Typ- IV-Pili Biogenese Außenmembranproteins PilQ Vorläufers (<i>pilQ</i>)	
PA14_60290 *	PA14_60290::MAR2xT7, marines Transposon integriert in Gen des Typ- IV-Pili Biogeneseproteins PilW (<i>pilW</i>)	
PA14_05180 *	PA14_05180::MAR2xT7, marines Transposon integriert in Gen des <i>twitching motility</i> Proteins PilT (<i>pilT</i>)	
BT2, BT72, BT73, RN3, RN43, RN45, NN84	Klinische CF Isolate	Prof. Dr. Burkhard Tümmeler, Medizinische Hochschule Hannover, Deutschland
PACF15, PACF21, PAKL1, PAKL4, PACF60, PACF61, PACF62, PACF63	Klinische CF Isolate	Prof. Dr. Gerd Döring, Tübingen, Deutschland
MH18, MH19, MH26, MH29	Klinische Isolate aus Harnwegsinfektionen	Dr. M. Hogardt, München, Deutschland

Tabelle 6: Verwendeter *E. coli*-Stamm.

<i>E. coli</i> -Stamm	Beschreibung	Referenz/Quelle
DH10B	F- <i>endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ-</i>	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Sterilisation

Die Sterilisation von Medien, Lösungen und Gebrauchsgegenständen erfolgte durch Autoklavieren mit Heißdampf bei 121 °C und 2 bar für 20 min. Hitzeempfindliche Lösungen wurden durch einen Zelluloseacetat-Filter mit der Porengröße 0,2 µm (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) sterilfiltriert.

2.2.2 Bakterienkultivierung

Übernachtskulturen

Für die Kultivierung von Übernachtskulturen (ü. N. Vorkultur) wurden 5 mL CASO-Bouillon in ein Reagenzglas gefüllt, mit Einzelkolonien von Plattenkulturen angeimpft und ü. N. bei 37 °C, aerob und bei 200 rpm inkubiert.

Kultivierung in Flüssigkulturen

Hauptkulturen wurden in 300 mL Schikanekolben mit 50 mL des Mediums, mit einer optischen Dichte (OD) von 0.05 aus ü. N. Vorkulturen angeimpft und bei 37 °C, aerob und 200 rpm kultiviert.

Kultivierung auf Festmedien

Zur Kultivierung auf Festmedien erfolgte die Entnahme des Bakterienmaterials mit einer sterilen Impföse aus einer Glycerin-Gefrierkultur oder aus Flüssigkulturen und anschließendem Ausstreichen auf Festmedium. Die Inkubation der Platten erfolgte ü. N. bei 37 °C, aerob.

2.2.3 Lagerung von Bakterien

Für die längerfristige Lagerung von Bakterien wurden Glycerin-Gefrierkulturen angelegt. Dazu wurden 700 µL einer ü. N. Vorkultur mit 300 µL sterilem 80%igem (w/v) Glycerin gemischt und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Lagerung bei -80 °C.

2.2.4 Bestimmung von Zelldichten

Die Bestimmung von Zelldichten in Flüssigkulturen erfolgte in einem Photometer durch die Messung der OD bei einer Wellenlänge von 578 nm.

Dabei wurde davon ausgegangen, dass eine OD von 1 einer Zelldichte von 1×10^9 Zellen/mL entspricht (Eschbach, 2004).

2.2.5 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (cfu)

Zur Bestimmung der cfu wurden mit Bakteriensuspensionen dezimale Verdünnungsreihen angefertigt. Anschließend wurden geeignete Verdünnungen auf CASO-Agar Platten ausplattiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden die Kolonien gezählt und unter Berücksichtigung der ausgezählten Verdünnungsstufe die cfu/mL berechnet.

2.2.6 Hitzeinaktivierung von *P. aeruginosa*

Zur Inaktivierung von *P. aeruginosa* durch Hitze wurden Bakteriensuspensionen für 15 min bei 95 °C inkubiert. Die Überprüfung erfolgte durch die Bestimmung der cfu (Kap. 2.2.5).

2.2.7 Vermehrung von Phagen

Zur Vermehrung von Phagen wurden diese mit der entsprechenden *P. aeruginosa* ü. N. Vorkultur versetzt. Dabei wird die Phagensuspension mit der *P. aeruginosa* Kultur in einem Verhältnis von 1:1 (Phagen (mL):*P. aeruginosa* (mL)) versetzt und für 15 min bei 200 rpm, 37 °C inkubiert. Anschließend wird dieses Gemisch in einem Verhältnis von 1:100 (Phagen/*P. aeruginosa* (mL):CASO-Bouillon (mL)) zu CASO-Bouillon gegeben und für ca. 24 h bei 37 °C und 120 rpm inkubiert.

2.2.8 Aufreinigung von Phagen

Nach der Vermehrung von Phagen wurden die Kulturen entweder mit Chloroform geschüttelt und sterilfiltriert, wobei noch Rückstände von *P. aeruginosa*-Zellfragmenten in der Phagensuspension verbleiben können. Alternativ wurden die Phagen mittels CsCl (Cäsiumchlorid)-Dichtegradient aufgereinigt (modifiziert nach Boulanger 2009). Mit Hilfe des CsCl-Gradienten können hochreine Phagensuspensionen gewonnen werden. Dazu erfolgte zunächst nach der Vermehrung eine PEG (Polyethylenglykol)-Präzipitation zur Aufkonzentrierung der Phagen. Dazu wurde die Kultur der Phagen Vermehrung mit einer Endkonzentration von 5 % (v/v) Chloroform versetzt und für 15 min bei 37 °C und 120 rpm inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 500 mM NaCl (Endkonzentration) und der Inkubation bei 4 °C für 1 h sowie eine Zentrifugation bei $8.000 \times g$ für 30 min und 4 °C. Der Überstand wurde abgenommen und mit 10 % PEG 6000 versetzt und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine weitere Zentrifugation bei $10.000 \times g$ für 15 min bei 4 °C wobei die Phagen aufkonzentriert wurden. Der Überstand wurde verworfen und die Phagen-Präzipitate in TM-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Extraktion mit Chloroform im Verhältnis von 1:1 zur weiteren Aufreinigung. Für den CsCl-Dichte-Gradienten wurden verschiedene CsCl-Dichtekonzentrationen übereinander geschichtet: $d = 1,6$ (1 mL), $d = 1,5$ (2 mL), $d =$

1,4 (3 mL), d = 1,3 (3 mL) (Ultra-Clear™ Centrifuge Tubes, Beckman Coulter). Anschließend wurden 4 mL von der Phagensuspension darauf geschichtet und bei 120.000 x g, für 2,5 h und 4 °C zentrifugiert. Die Phagen, die sich zwischen d = 1,6 und d = 1,5 befanden, wurden abgenommen und gegen TM-Puffer dialysiert. Für die weitere Verwendung wurden die Phagensuspensionen bei 4 °C gelagert.

2.2.9 Bestimmung des Phagentiters

Zur Bestimmung der Plaque-bildenden Einheiten pro Milliliter (*plaque-forming-units*, pfu/mL) wurden Topagar-Platten verwendet. Dazu wurde eine *P. aeruginosa* ü. N. Vorkultur im Verhältnis von 1:100 zum Topagar gegeben und jeweils 4 – 5 mL auf CASO-Agar-Platten gegossen. Von der Phagensuspension wurde eine dezimale Verdünnungsreihe in SM-Puffer angelegt und jeweils 20 µL der entsprechenden Verdünnungsstufen auf Topagarplatten aufgetropft. Die Inkubation der Platten erfolgte für 14 – 16 h bei 37 °C. Die von einzelnen Phagen resultierenden Plaques wurden gezählt und die pfu/mL bestimmt.

2.2.10 Lagerung von Phagen

Für die längerfristige Lagerung von Phagen wurden Glycerin-Gefrierkulturen angelegt. Dazu wurden 850 µL einer Phagensuspension mit 150 µL sterilem 15%igem (w/v) Glycerin gemischt und bei -80 °C gelagert.

2.2.11 Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden von Prof. Dr. Manfred Rohde (Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung) durchgeführt.

2.2.12 Bestimmung des Phagen-Rezeptors

Dazu wurden Topagar-Platten (siehe Kap. 2.2.9) mit entsprechenden *P. aeruginosa*-Mutanten angefertigt und mit 20 µL der Phagensuspension betropft. Nach der Inkubation bei 37 °C für 14 – 16 h wurden die auftretenden Plaques dokumentiert.

2.2.13 Untersuchung der Wachstumseigenschaften von Phagen

Für die Bestimmung des Wachstumsverhaltens der untersuchten Phagen wurden Wachstumsversuche (*one-step growth curves*) mit einigen Modifikationen nach Pajunen *et al.* (2000) durchgeführt. Dazu wurde *P. aeruginosa* aerob in CASO-Bouillon bis zur exponentiellen Wachstumsphase (OD₅₇₈ von 0,3 - 0,5) kultiviert und im Anschluss mit einer MOI (Carlson, 2005; *multiplicity of infection*) von 0,01 mit einer Phagensuspension vermengt. Nach einer 15 minütigen Vorinkubation bei 37 °C erfolgte eine logarithmische Verdünnung in CASO-Bouillon. Diese Verdünnungsstufen wurden weiter bei 37 °C inkubiert und nach jeweils 5 min erfolgte eine Probenahme von jeder Verdünnungsstufe, die mit

Hilfe von Topagar-Platten (siehe Kap. 2.2.9) ausgewertet wurden. Die Zahl der freigesetzten Phagen pro Bakterienzelle (*burst size*) wird wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Plateau der freigesetzten Phagen}}{(\text{Anfangstiter-Titer nach Phagenadsorption})} = \text{Zahl freigesetzter Phagen pro Bakterienzelle}$$

2.2.14 Untersuchung des Infektionsverhaltens von immobilisierten Phagen im Vergleich zu freien Phagen

Für die Überprüfung des Infektionsverhaltens der Phagen (siehe Kap. 2.3.1) wurden Wachstumsexperimente durchgeführt. Dazu wurde *P. aeruginosa* aerob in CASO-Bouillon bis zur exponentiellen Wachstumsphase (OD₅₇₈ von 0,3 - 0,5) kultiviert. Danach wurden 5×10^7 Zellen/25 µL und 1×10^4 Phagen-Nanopartikel/25 µL bzw. 1×10^4 pfu/25 µL zusammen im Thermocycler inkubiert (20 min, 37 °C, 300 rpm). Im Anschluss erfolgte eine logarithmische Verdünnung in 450 µL CASO-Bouillon, die weiterhin bei 37 °C und 300 rpm inkubiert wurde. Die Probenahme erfolgte alle 30 min in dem von jeder Verdünnungsstufe 20 µL entnommen und auf Topagarplatten zur Titerbestimmung (siehe Kap. 2.2.9) getropft wurden. Weiterhin wurden Kontrollen der immobilisierten Phagen (siehe Kap. 2.3.1) angefertigt. Zum einen wurden die immobilisierten Phagen ohne *P. aeruginosa*, wie oben beschrieben, für 7 h inkubiert. Dabei erfolgten die Probenahmen alle 2 h (Kontrolle 1). Zum anderen wurden die immobilisierten Phagen mit dem zellfreien Überstand einer *P. aeruginosa*-Kultur, wie oben beschrieben, für 5 h inkubiert. Dabei erfolgte die Probenahme ebenfalls alle 2 h (Kontrolle 2). Die Proben für die Titerbestimmung enthielten neben den neugebildeten Phagen auch die eingesetzten immobilisierten Phagen-Nanopartikel.

2.2.15 Überprüfung des Infektionsverhaltens der immobilisierten Phagen auf einem Filter

Zur besseren Anwendung des Phagen-Schnelltests wurden die immobilisierten Phagen auf einem Filter (0,2 µm, Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) inkubiert. Für die Überprüfung des Infektionsverhaltens wurden Wachstumsexperimente durchgeführt. Dazu wurden 1×10^4 Phagen-Nanopartikel und 5×10^7 Zellen (aus einer exponentiell gewachsenen *P. aeruginosa*-Kultur) mit einer Spritze auf einen Filter gegeben und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Probenahme erfolgte alle 30 min in dem jeweils 500 µL CASO-Bouillon durch den Filter gedrückt wurden. Von den gewonnenen Proben erfolgte eine Titerbestimmung gemäß Kap. 2.2.9. Des Weiteren wurden folgende Kontrollen angefertigt. Zum einen wurden die immobilisierten Phagen ohne *P. aeruginosa*, wie oben beschrieben, für 7 h inkubiert. Dabei erfolgte die Probenahme alle 2 h (Kontrolle 1). Zum anderen wurden die immobilisierten Phagen mit dem zellfreien Überstand einer *P. aeruginosa*-Kultur, wie oben beschrieben, für 5 h inkubiert. Dabei erfolgte die Probenahme ebenfalls alle 2 h, wobei jeweils 500 µL des zellfreien Überstandes der *P. aeruginosa*-Kultur durch den Filter gedrückt wurden (Kontrolle 2).

2.2.16 Wachstumsexperimente von immobilisierten Phagen zur Bestimmung der Ablöserate und des Endtiters

1×10^3 bzw. 1×10^4 Phagen-Nanopartikel/mL wurden mit 1×10^6 Z/mL oder ohne *P. aeruginosa* für 3 h bei 37 °C und leichtem Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm) und vom Filtrat der Phagentiter der neugebildeten bzw. sich ablösenden Phagen bestimmt (Kap. 2.2.9).

2.2.17 Phagen-Schnelltest zur Detektion von lebenden *P. aeruginosa* Bakterien

Für die Immobilisierung des Phagen JG024 an die Dynabeads® M-280 Streptavidin wurden 1×10^9 pfu/mL verwendet. Der Nachweis von *P. aeruginosa* erfolgte durch die Zugabe von 1×10^4 Phagen-Nanopartikel zu 1×10^6 Zellen/mL (Gesamtvolumen 1 mL). Dies wurde für 3 h bei 37 °C in einem Thermomixer inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe filtriert (Porengröße 0,2 µm), das Filtrat mit 1 mL Fällungslösung versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA isoliert. Dazu wurden 50 µL Lysisreagenz (ADL-LR01, AMODIA Bioservice GmbH, Braunschweig, Deutschland) zur Probe gegeben, für 15 min bei 95 °C inkubiert und mit 50 µL Neutralisierungspuffer (ADL-NB01, AMODIA Bioservice GmbH, Braunschweig, Deutschland) gestoppt. Diese DNA wurde mittels PCR amplifiziert (Tabelle 11 und Tabelle 12) und mit einer Detektionssonde hybridisiert (siehe Kap. 2.4.7). Abschließend erfolgte die Detektion auf dem Lateral Flow Dipstick (LFD; ADL-B01, AMODIA Bioservice GmbH, Braunschweig, Deutschland). Dazu wurden 150 µL Chromatographie Puffer 01 (ADL-B01, AMODIA Bioservice GmbH, Braunschweig, Deutschland) in eine Mikrotiterplatte gegeben, 6 µL des Reaktionsansatzes auf die lila Fläche des LFD aufgetragen und in den Puffer gestellt. Nach 20 min erfolgte die Dokumentation des Ergebnisses, durch das Erscheinen von Banden auf dem LFD. Die Etablierung des Protokolls des Phagen-Schnelltests erfolgte in Kooperation mit AMODIA Bioservice GmbH (Braunschweig, Deutschland).

Fällungslösung	30 % PEG 6000
	3 M NaCl

2.2.18 Artifizuell verkeimte Kosmetikproben

Zuerst erfolgte eine Inaktivierung des Produkts (Gesichtscreme (Aok Tagespflege; Henkel, Düsseldorf, Deutschland), Waschgel (Aok Bio Expert Waschgel; Henkel, Düsseldorf, Deutschland), Duschcreme (Fa Joghurt Body Smoothie Granatapfel und Himbeere; Henkel, Düsseldorf, Deutschland) bereitgestellt von AMODIA Bioservice GmbH, Braunschweig, Deutschland) durch die Zugabe von 9 mL Inaktivatorlösung zu 1 mL Kosmetikprodukt für 15 min. Im Anschluss wurde das inaktivierte Produkt im Verhältnis von 1:10 zu 1,1-fach konzentrierter CASO-Bouillon hinzugefügt und mit *P. aeruginosa* angeimpft und bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert (siehe Kap. 2.2.2).

Inaktivatorlösung	5,5 g/L	Glukose
	5,0 g/L	Pepton aus Sojabohnenmehl
	700,0 mg/L	L-Cystein
	200,0 mg/L	Natriumsulfit

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Immobilisierung der Phagen an magnetische Nanopartikel

Für die Immobilisierung der Phagen wurden magnetische Nanopartikel verwendet. Zur Überprüfung der erfolgreichen Immobilisierung erfolgte die Titerbestimmung gemäß Kap. 2.2.9. Dazu wurden die immobilisierten Phagen-Dynabeads logarithmisch verdünnt und auf Topagarplatten aufgetropft. Dabei entsprach ein Plaque einem Dynabead an dem mindestens ein Phage immobilisiert wurde und wird bezeichnet als Phagen-Nanopartikel/mL. Durch die Subtraktion der abgewaschenen Phagen (siehe Anleitung des Herstellers) von den eingesetzten Phagen, konnte die Menge der tatsächlich immobilisierten Phagen bestimmt werden. Durch die Division der tatsächlich immobilisierten Phagen durch die Anzahl an gebundenen Dynabeads konnte die Menge an Phagen pro Dynabead bestimmt werden. Parallel zur Immobilisierung erfolgte ein Kontrollansatz in dem die Phagen allein ohne magnetische Nanopartikel mit den verwendeten Reagenzien entsprechend inkubiert wurden, so dass mögliche Einflüsse auf die Phagen Vitalität überprüft werden konnten.

2.3.1.1 Immobilisierung der Phagen an Dynabeads® M-270 Epoxy

Zur Immobilisierung der Phagen wurden Dynabeads® M-270 Epoxy (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) verwendet. Dabei erfolgt eine direkte kovalente Bindung der Epoxygruppen der Dynabeads mit primären Amino- oder Sulfhydrylgruppen des zu bindenden Substrates. Der Reaktionsablauf ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben mit folgenden Änderungen. Die Dynabeads® M-270 Epoxy wurden in DMF resuspendiert (ca. 2×10^9 beads/mL). Für die Immobilisierung wurden ca. $3,3 \times 10^8$ Nanopartikel (= 165 μ L) und 100 μ L Phagensuspension (Ligand), einer definierten Konzentration, verwendet. Der Immobilisierungsansatz wurde für ca. 24 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Dynabeads im E1-Puffer gewaschen und resuspendiert. Nach jedem Waschschrift wurde der Überstand aufgefangen und der Phagentiter der abgewaschenen Phagen bestimmt (Kap. 2.2.9). Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

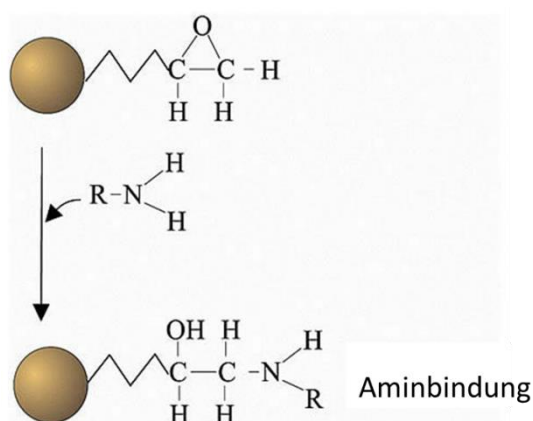


Abbildung 2: Reaktionsschema der Dynabeads® M-270 Epoxy (Thermo Fisher Scientific).

Die Immobilisierung erfolgt über eine direkte kovalente Bindung der Epoxygruppen auf der Oberfläche mit primären Amino- oder Sulfhydrylgruppen des Substrats.

Optimiertes Protokoll der Immobilisierung

Zusätzlich zum Immobilisierungsansatz nach Herstellerangaben (Dynabeads, Phagen, Puffer A und B) erfolgte die Zugabe von 0,1 % BSA. Nach der 24 stündigen Inkubation wurden die Phagen-Nanopartikel viermal in PBS mit 0,1 % BSA gewaschen und für 10 min in PBS mit 0,5 % Tween20 inkubiert. Die Aufnahme der Phagen-Nanopartikel erfolgte in PBS mit 0,1 % BSA und wurden bei 4 °C gelagert. Die Bestimmung des Phagentiters erfolgte mit Hilfe von Topagar-Platten (siehe Kap. 2.2.9).

2.3.1.2 Immobilisierung der Phagen an Dynabeads® M-270 Carboxylic Acid

Die Immobilisierung der Phagen erfolgte an Dynabeads® M-270 Carboxylic Acid (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland). Die Carbonsäuregruppen auf der Oberfläche ermöglichen eine kovalente Amidbindung mit primären Amino- oder Sulfhydrylgruppen des Liganden. Zuvor erfolgt eine Aktivierung der Oberfläche durch das Carbodiimid EDC. Das Bindungsschema ist in der Abbildung 3 dargestellt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Dabei wurden ca. $3,3 \times 10^8$ Nanopartikel (= 165 µL) und 100 µL Phagensuspension (Ligand) einer definierten Konzentration verwendet. Zudem wurden drei verschiedene Protokolle nach Herstellerangaben durchgeführt.

1. Zwei-Schritt Bindeverfahren (ohne NHS)

Zur Aktivierung der Dynabeads wurden 200 µL einer 50 mg/mL konzentrierten EDC-Lösung (in Wasser) zu den Dynabeads hinzugefügt und inkubiert. Für die Immobilisierung wurden die Dynabeads mit 100 µL einer Phagensuspension und 100 µL 50 mM MES (pH 5) versetzt. Zum anschließenden Waschen der Dynabeads wurden 165 µL Tris (pH 7,4) verwendet und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Dynabeads viermal mit 1 mL PBS gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde der Überstand aufgefangen und der Phagentiter der abgewaschenen Phagen bestimmt (Kap. 2.2.9).

2. Zwei-Schritt Bindeverfahren (mit NHS)

Die Aktivierung der Dynabeads erfolgte nach Herstellerangaben. Zur Immobilisierung wurden die Dynabeads mit 100 µL einer Phagensuspension

und 100 μL 25 mM MES (pH 5) versetzt. Die Waschschr tte erfolgten wie zuvor beschrieben.

3. Ein-Schritt Bindeverfahren

Die vorbereiteten Dynabeads wurden mit 100 μL Phagensuspension und 100 μL 25 mM MES (pH 5) versetzt und inkubiert. Im Anschluss wurden 50 μL einer 100 mg/mL konzentrierten EDC-Lösung und 100 μL 25 mM MES (pH 5) hinzugefügt und weiter inkubiert. Die Waschschr tte erfolgten wie zuvor beschrieben.

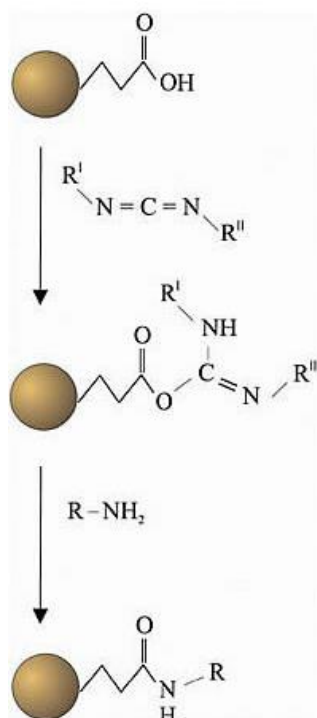


Abbildung 3: Bindungsschema der Dynabeads[®] M-270 Carboxylic Acid (Thermo Fisher Scientific).

Es erfolgt eine kovalente Amidbindung durch die Carbonsäuregruppen auf der Oberfläche und der primären Amino- oder Sulfhydrylgruppen des Liganden. Zuvor erfolgt eine Aktivierung durch das Carbodiimid EDC.

2.3.1.3 Immobilisierung der Phagen an Roti[®]-MagBeads COOH HP58

Für die Immobilisierung der Phagen wurden Roti[®]-MagBeads COOH HP58 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Diese besitzen eine Silica-Oberfläche mit Carbonsäuregruppen, die eine stabile Amidbindung mit den Aminogruppen des Liganden bilden können. Zuvor erfolgt eine Aktivierung der Oberfläche durch das Carbodiimid EDC. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben mit folgenden Änderungen. Für die Immobilisierung wurden ca. $3,3 \times 10^8$ Nanopartikel (= 37 μL) eingesetzt und zweimal mit 500 μL Waschpuffer (zur Immobilisierung; siehe Herstellerangaben) gewaschen. Im Anschluss wurden die Nanopartikel dreimal in 500 μL 100 mM MES (pH 5) gewaschen. Danach wurden die Nanopartikel in 500 μL 100 mM MES (pH 5), mit 20 mg EDC und 20 mg NHS resuspendiert und für 15 min bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert. Nachfolgend wurden die Nanopartikel erneut mit 100 mM MES (pH 5) gewaschen und zur Immobilisierung mit 100 μL Phagensuspension und 400 μL PBS versetzt und

für 2 h inkubiert. Die folgenden Waschschr tte erfolgten nach Herstellerangaben, wobei die Überstände aufgefangen und der Phagentiter der abgewaschenen Phagen bestimmt wurde (Kap. 2.2.9). Die Nanopartikel wurden am Ende in 100 μL Waschpuffer (zur Immobilisierung) aufgenommen und bei 4 $^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.3.1.4 Immobilisierung der Phagen an Dynabeads[®] M-280 Streptavidin

Die Immobilisierung der Phagen erfolgte an die Dynabeads[®] M-280 Streptavidin (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland). Diese besitzen einen Monolayer aus Streptavidin, das biotinylierte Liganden bindet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben unter Verwendung des Protokolls zur Immobilisierung von Antikörpern/Proteinen mit folgenden Änderungen. Für die Immobilisierung wurden ca. $2,1 \times 10^8$ Nanopartikel eingesetzt und mit 300 μL PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Dynabeads erneut mit 300 μL PBS versetzt sowie mit 100 μL einer definiert konzentrierten und biotinylierten (Kap. 2.3.2) Phagensuspension. Nach erfolgter Inkubation wurden die Dynabeads viermal in 1 mL PBS mit 0,1 % BSA gewaschen und in 105 μL desselben Puffers aufgenommen ($= 2 \times 10^9$ Dynabeads/mL). Nach jedem Waschschr tt wurde der Überstand aufgefangen und der Phagentiter der abgewaschenen Phagen bestimmt (Kap. 2.2.9). Die Lagerung erfolgte bei 4 $^{\circ}\text{C}$.

2.3.2 Biotinylierung von Phagen

Zur Biotinylierung wurden verschiedene Biotine verwendet. EZ-LinkTM Sulfo-NHS-Biotin reagiert mit primären Aminen und besitzt ein sehr kurzes Trägermolekül (*spacer-arm*; 13,5 Ångström). Sulfo-NHS-LC-Biotin reagiert mit Aminen und besitzt ebenfalls ein Trägermolekül (*spacer-arm*), das jedoch länger ist (22,4 Ångström). Dieses Trägermolekül (*spacer-arm*) erhöht die Zugänglichkeit des Biotins zu relativ tief gelegenen Biotinbindestellen des Streptavidins. Die Sulfo-Gruppe der beiden Biotine erhöht die Wasserlöslichkeit. D-Biotin Succinimidyl Ester reagiert ebenfalls mit Aminen, besitzt aber kein Trägermolekül (*spacer-arm*). Biotin Ethylendiamin reagiert mit Aldehyden und Ketonen und N -(3-maleimidylpropionyl)biocytin reagiert mit Thiolen. Für die Biotinylierung wurden die Phagen in PBS-Puffer aufgenommen und mit den entsprechenden Mengen an Biotin (siehe Tabelle 7) nach Herstellerangaben bei Raumtemperatur inkubiert. EZ-LinkTM Sulfo-NHS-Biotin wurde direkt zur Phagensuspension gegeben. Die restlichen Biotine wurden zuvor in DMSO gelöst. Nach der Inkubation erfolgte eine Dialyse in PBS-Puffer  . N. bei 4 $^{\circ}\text{C}$.

Tabelle 7: Verwendete Biotine.

(-) wurde aufgrund von Präzipitatbildung nicht verwendet.

Biotin	JG012	JG024
EZ-Link TM Sulfo-NHS-Biotin	1 mg/mL	1 mg/mL
D-Biotin Succinimidyl Ester	1 mg/mL	5 mg/mL
Sulfo-NHS-LC-Biotin	1 mg/mL	5 mg/mL
Biotin Ethylendiamin (N-(2-Aminoethyl)Biotinamid, Hydrobromid)	5 mg/mL	5 mg/mL
N�-(3-maleimidylpropionyl)biocytin	-	-

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Plasmid-DNA-Präparation

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurden 4 mL einer ü. N. Kultur für 15 min bei 13.000 rpm geerntet und unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Konzentration wurde mit Hilfe eines Photometers (Nanodrop ND-1000, PEQLAB, Erlangen, Deutschland) bestimmt.

2.4.2 Isolierung genomischer Phagen-DNA

Für die Etablierung eines Protokolls zur Isolierung hochreiner Phagen-DNA ohne Degradierungen und einer entsprechenden Ausbeute wurden verschiedene Protokolle getestet. Für die Isolierung wurden filtrierte Phagensuspensionen (siehe Kap. 2.2.8) verwendet, die zunächst vorbereitet werden mussten.

2.4.2.1 Probenvorbereitung

Zur Hydrolyse genomischer *P. aeruginosa* DNA und RNA wurde die Phagensuspension mit DNase I, RNase A und $MgCl_2$ inkubiert. Dabei wurden Endkonzentrationen von 20 µg/mL - 500 µg/mL DNase I, 55 µg/mL - 500 µg/mL RNase A und 5 mM - 10 mM $MgCl_2$ getestet sowie Inkubationszeiten von 30 - 60 min. Im Anschluss erfolgte eine Aufkonzentrierung der Phagen durch die Zugabe von Fällungslösung (im Verhältnis 1:5) (siehe Kap. 2.2.17). Dazu wurden die Proben entweder für ca. 16 h ü. N. bei -20 °C oder für ca. 1 h auf Eis inkubiert. Zuletzt erfolgte die Inkubation mit 0,5 mg/mL (Endkonzentration) Proteinase K und 0,5 % (Endkonzentration) SDS für ca. 1 h bei 56 °C.

2.4.2.2 DNA-Aufreinigung

Zur Aufreinigung der Phagen-DNA wurden verschiedene Kits und Protokolle angewendet:

QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen

Die DNA-Präparation erfolgte nach Herstellerangaben ab Schritt 3 (QIAprep® Miniprep Handbook 2006, Qiagen, Hilden, Deutschland). Zur Erhöhung der Reinheit wurden Änderungen bezüglich der Waschschriffe vorgenommen. Dazu wurde der Waschschriff mit dem PE-Puffer mehrmals wiederholt, der Waschpuffer für mind. 5 min inkubiert oder der Waschschriff mit dem PB-Puffer nicht durchgeführt, um mögliche Kontaminationen mit Guanidinhydrochlorid zu vermeiden. Weiterhin wurden Modifizierungen bezüglich der Elution durchgeführt, um Verbesserungen der DNA-Ausbeute zu erzielen. Dazu wurde das zur Elution verwendete Wasser auf 50 °C bzw. 70 °C erhitzt. Weiterhin wurden TE-Puffer und EB-Puffer zur Elution getestet sowie der pH-Wert des Wassers zur Elution überprüft und eingestellt (sollte zur Elution bei pH 7 - 8 liegen).

EB-Puffer	10	mM	Tris-HCl, pH 8,5
TE-Puffer	10	mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1	mM	EDTA

DNeasy® Blood & Tissue Kit von Qiagen

Die Isolierung der DNA erfolgte nach Herstellerangaben ab Schritt 2 mit voriger RNase A Inkubation (Purification of total DNA from animal blood or cells, DNeasy® Blood & Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland). Zur Erhöhung der Reinheit wurden Änderungen bezüglich der Waschschriffe vorgenommen. Dazu wurde der Waschschriff mit dem AW2-Puffer mehrmals wiederholt, der Waschpuffer für mind. 5 min inkubiert oder der Waschschriff mit dem AW1-Puffer gestrichen, um mögliche Kontaminationen mit Guanidinhydrochlorid zu vermeiden. Weiterhin wurden Modifizierungen bezüglich der Elution durchgeführt, um Verbesserungen der DNA-Ausbeute zu erzielen. Dazu wurde das zur Elution verwendete Wasser auf 50 °C bzw. 70 °C erhitzt. Weiterhin wurden TE-Puffer und EB-Puffer zur Elution getestet sowie der pH-Wert des Wassers zur Elution überprüft und eingestellt (sollte zur Elution bei pH 7 - 8 liegen).

QIAEX II Gel Extraction Kit von Qiagen

Unter Verwendung des QIAEX II Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden Deutschland) nach Herstellerangaben erfolgte die Aufreinigung der DNA aus einem Agarosegel (Kap. 2.4.3) zur Beseitigung von Degradierungen.

Klassische Phenol-Chloroform-Extraktion

Die vorbereitete Phagensuspension wurde mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform (Verhältnis 1:1) versetzt und extrahiert. Dazu wurde die Probe vorsichtig invertiert oder kräftig geschüttelt für ca. 30 s – 2 min. Im Anschluss wurde die Probe zur Phasentrennung für 1 - 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und die Extraktion mit Phenol-Chloroform wiederholt. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt bis keine Interphase mehr sichtbar war. Anschließend erfolgte eine Extraktion mit dem gleichen Volumen an Chloroform für mindestens dreimal. Im Anschluss wurde die Probe zur weiteren Aufreinigung und Elution mit den oben genannten Qiagen-Kits kombiniert oder mittels Ethanol bzw. Isopropanol gefällt. Dazu wurden verschiedene Ansätze getestet: 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 5,2) und 2,5 Volumen 100 % Ethanol; 1/25 Volumen 5 M NaCl und 2,5 Volumen 100 % Ethanol; 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 5,2) und 1 Volumen 100 % Isopropanol; 1/25 Volumen 5 M NaCl und 1 Volumen 100 % Isopropanol. Weiterhin wurde zur Präzipitation der DNA bei Raumtemperatur temperiertes oder eiskaltes Ethanol (100 %) getestet und für 20 min – 2 h auf Eis oder bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde die Probe für 20 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das DNA-Präzipitat wurde getrocknet und in Wasser aufgenommen.

Phase Lock Gel™ (PLG) von 5 Prime

Die DNA-Isolierung erfolgte mit dem DNA-Isolierungskit PLG (Light 15 mL Falcons; 5 Prime, Hamburg, Deutschland). Zur Aufkonzentrierung des Gels in den PLG Falcons wurden diese für 2 min bei 1.500 x g zentrifugiert. Anschließend wurde 1 mL Phagensuspension auf die Gelmatrix gegeben und zweimal mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform (Verhältnis 1:1) versetzt, invertiert und für 5 min bei 1.500 x g zentrifugiert. Nachfolgend erfolgte eine Extraktion mit dem gleichen Volumen an Chloroform mit anschließender Zentrifugation (5 min, 1.500 x g). Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 5,2) und 1 Volumen Isopropanol (100 %) versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung für 20 min bei 13.000 x g zentrifugiert und das DNA-Präzipitat zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in Wasser aufgenommen.

2.4.2.3 Protokoll zur Isolierung von Phagen-DNA

Zur Isolierung von Phagen-DNA wurde folgendes Protokoll etabliert: Die Phagensuspension (filtriert bzw. mittels CsCl-Dichte-Gradienten-Zentrifugation aufgereinigt; Kap. 2.2.8) wurden mit 500 µg/mL (Endkonzentration) DNase I und RNase A sowie 10 mM MgCl₂ (Endkonzentration) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die erfolgreiche Hydrolyse noch vorhandener *P. aeruginosa* DNA wurde mit einer *P. aeruginosa*-spezifischen PCR überprüft (Kap. 2.4.6). Bei der Verwendung von filtrierten Phagensuspensionen erfolgte eine Aufkonzentrierung der Phagen mit Fällungslösung (im Verhältnis 1:5) (siehe Kap. 2.2.17) für ca. 1 h auf Eis. Im Anschluss wurden die Proben mit 0,5 mg/mL (Endkonzentration) Proteinase K und 0,5 % (Endkonzentration) SDS für 1 h bei 56 °C, zur Inaktivierung der DNase I und zum Aufschluss der Phagen, inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Aufreinigung der DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion unter Verwendung des PLG von Prime (siehe oben) oder unter Verwendung des klassischen Protokolls. Dazu wurden die Proben mit dem gleichen Volumen an Phenol-Chloroform (Verhältnis 1:1) versetzt, für 1 min vorsichtig invertiert und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und die Extraktion solange wiederholt bis keine Interphase mehr sichtbar war. Im Anschluss erfolgte eine dreimalige Extraktion mit Chloroform. Zur Fällung der DNA wurde die resultierende Probe mit 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 5,2) und 1 Volumen 100 % Isopropanol bzw. 1,5 Volumen 100 % Ethanol (Raumtemperatur) versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss für 20 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, das DNA-Präzipitat getrocknet und in Wasser aufgenommen. Die Konzentration wurde unter Verwendung des Photometers (Nanodrop ND-1000, PEQLAB, Erlangen, Deutschland) bestimmt.

2.4.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Durch die Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente im elektrischen Feld ihrer molekularen Masse nach aufgetrennt werden. Dazu wurden meist

1%ige (w/v) Agarosegele (in TAE-Puffer) verwendet. Vor dem Beladen des Agarosegels wurde die DNA mit 6-fachem DNA-Ladepuffer im Verhältnis 1:6 vermischt. Als Größenstandard (Marker) diente der GeneRuler™ DNA Ladder Mix, GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder oder GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder von Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland). Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V. Zur Visualisierung der separierten DNA-Fragmente wurde das Agarosegel in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,1 % (v/v)) für 10 – 20 min inkubiert und unter UV-Licht betrachtet.

2.4.4 Restriktion der DNA

Die Hydrolyse von DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen und dem entsprechenden Puffer nach Herstellerangaben (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland). Die Inkubation erfolgte für 4 h bei der entsprechenden Temperatur. Zur Visualisierung wurde die hydrolysierte DNA im Anschluss elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Kap. 2.4.3). Für die Restriktion der Phagen-DNA zur Generierung von kurzen Sequenzabschnitten mit stumpfen Enden (*blunt ends*) erfolgte eine Inkubation der JG012 DNA mit dem Enzym *BsaAI*, der JG054 und JG057 DNA mit *AfeI*.

2.4.5 Bestimmung der Phagen Genomstruktur: linear vs. zirkulär

Zur Identifizierung eines linearen oder zirkulären Genoms erfolgte die Behandlung der DNA mit der Exonuklease *Bal31* gemäß Loessner *et al.* (2000) mit einigen Modifizierungen. Die Zusammensetzung des Ansatzes zur Hydrolyse mit dem Enzym *Bal31* ist in der Tabelle 8 dargestellt. Die Inkubation erfolgte für 15 min, 30 min und 45 min bei 30 °C. Nach den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Proben mit 20 mM EGTA für 10 min bei 65 °C inkubiert, um die Reaktion abzustoppen. Im Anschluss wurde die DNA mit 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 5,2) und 1,5 Volumen 100 % Ethanol versetzt und für ca. 15 min inkubiert. Danach für 20 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Das DNA-Präzipitat wurde anschließend für mind. 2 h mit einer Restriktionsendonuklease hydrolysiert und zur Visualisierung elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 2.4.3, 2.4.4). Das Enzym *Bal31* hydrolysiert lineare dsDNA simultan von beiden Enden.

Tabelle 8: Zusammensetzung des Ansatzes zur Hydrolyse mit dem Enzym *Bal31*.

Reagenz	Konzentration/Volumen
DNA	1 - 2 µg
<i>Bal31</i>	4 Units
2x Reaktionspuffer	1-fach
Milli-Q H ₂ O	ad. 20 µL

2.4.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wird zur Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte eingesetzt. In dieser Arbeit wurde ein Volumen von 20 µL sowie die *Taq* DNA Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt a. Main, Deutschland) verwendet. Tabelle 9

zeigt die Zusammensetzung der angewendeten PCR zum Nachweis genomischer *P. aeruginosa*- und Phagen-DNA. Die entsprechenden Programme der Amplifikation sind in der Tabelle 10 sowie die verwendeten Primer in der Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 9: Zusammensetzung der PCR

Reagenz	Volumen [μ L]
10x Taq-Puffer	2,0
dNTPs (10 mM)	0,5
Vorwärts Primer (10 μ M)	1,0
Rückwärts Primer (10 μ M)	1,0
Matrize	1,0
Taq-Polymerase	0,2
Milli-Q H ₂ O	14,3

Tabelle 10: Programm der Amplifikation

Schritt	Nachweis genomischer <i>P. aeruginosa</i> DNA		Nachweis genomischer Phagen-DNA		
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit	
Initiale	95 °C	2 min	95 °C	30 s	
Denaturierung					
Denaturierung	95 °C	30 s	95 °C	20 s	} 30 Zyklen
Anlagerung	54 °C	30 s	54 °C	30 s	
Verlängerung	68 °C	15 s	68 °C	15 s	
Finale	68 °C	5 min	68 °C	5 min	
Verlängerung					
Abkühlung	4 °C	∞	4 °C	∞	

Die Zusammensetzung der PCR für den Phagen-Schnelltest (siehe Kap. 2.2.17) sowie des Programms zur Amplifikation sind in der Tabelle 11 und Tabelle 12 zusammengefasst. Das Volumen des Ansatzes betrug 50 μ L.

Tabelle 11: Zusammensetzung der PCR des Phagen-Schnelltests

Reagenz	Volumen [μ L]
5x Puffer	10,0
dNTPs (25 mM)	0,4
Primer A (10 μ M)	0,2
Primer B (10 μ M)	0,2
Matrize	3,0
Phusion-Polymerase (5 U)	0,5
Milli-Q H ₂ O	35,7

Tabelle 12: Programm der Amplifikation der Phagen-DNA des Phagen-Schnelltests

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	
Denaturierung	98 °C	5 s	} 25 Zyklen
Anlagerung	61 °C	10 s	
Verlängerung	72 °C	15 s	
Finale Verlängerung	72 °C	10 min	
Abkühlung	20 °C	3 min	

Tabelle 13: Verwendete Primer

Primer	Sequenz (5' → 3')	Größe PCR-Produkt
<i>gyrB</i> Vw (<i>P. aeruginosa</i>)	GACGCGTAACCTGAACAACT	117 bp
<i>gyrB</i> Rw (<i>P. aeruginosa</i>)	GGTACCTTCACCGAGATGAT	
JG012 Vw	CCGACTGAAGTGGATCGCAA	
JG012 Rw	GGCTGGTAGAACGAGGAAGG	330 bp
JG024 Vw	CTAAGGCAGGAAGTCGCAGC	
JG024 Rw	ATAACGCAGGGACTGACCGA	
JG054 Vw	GTGGAATACCGGCACAAAGC	322 bp
JG054 Rw	CGCGTACTCAACAGCAAAGG	
JG057 Vw	CTGTACCTGAAGGGCTGCAA	
JG057 Rw	GGTCTCCTAAGCGATGGACG	373 bp
Primer A: JG024orf79-1	GCTCCACGAACTCCTCCAAA	
Primer B: JG024orf79-2-bio	BiotinGTAGAAATCGGCCAAACCGC	

2.4.7 Hybridisierung von Detektionssonden

Zur Detektion der Phagen-DNA mittels LFD im Phagen-Schnelltest (siehe Kap. 2.2.17) erfolgte die Hybridisierung einer Detektionssonde (Tabelle 15), die mittels LFD nachgewiesen werden kann. Dazu wurden nach der PCR (siehe Tabelle 11 und Tabelle 12) 5 µL des Hybridisierungsansatzes (siehe Tabelle 14) hinzugefügt. Das Programm der Hybridisierung ist in der Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 14: Zusammensetzung der Hybridisierungsreaktion

Reagenz	Konzentration	Volumen [µL]
Tris-HCl, pH 7,5	1,0 M	5
EDTA pH 8,0	500,0 mM	10
Tween20	10,0 %	25
NaN ₃	5,0 %	5
JG024 orf79-So	10,0 pmol/µL	6
Milli-Q H ₂ O		ad. 495

Tabelle 15: Verwendete Detektionssonde

Sonde	Sequenz (5' → 3')
JG024orf79-So	6FAMCGTTTCGTGGACGAGTCGGGC

Tabelle 16: Programm der Hybridisierung

Temperatur	Zeit
95 °C	4 min
61 °C	4 min

2.4.8 Ligation von DNA

Die mittels Restriktionsendonukleasen geschnittene Phagen-DNA wurde unter Verwendung des QIAquick® PCR Purification Kit aufgereinigt und die entstandenen Produkte in den Vektor pJET1.2 ligiert. Dazu wurde das CloneJET PCR Cloning Kit der Firma Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) verwendet. In Tabelle 17 ist der Ligationsansatz dargestellt. Nach

sorgfältiger Durchmischung wurde der Ligationsansatz für 20 min bei 22 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Transformation in *E. coli* DH10B CaCl₂-kompetenter Zellen.

Tabelle 17: Ligation mit Vektor pJET1.2

Reagenz	Volumen [µL]
2x Reaktionspuffer	10
Hydrolysierte Phagen-DNA	10
pJET1.2/blunt cloning vector (50 ng/µL)	1
T4 DNA Ligase (5 U/µL)	1

2.4.9 Transformation von *E. coli* CaCl₂-kompetenter Zellen

Zur Herstellung von chemokompetenten *E. coli* Zellen wurde ausgehend von einer ü. N. *E. coli* DH10B Vorkultur eine Hauptkultur angeimpft (siehe Kap. 2.2.2) und bis zu einer OD₅₇₈ von 0,6 inkubiert. 50 mL der Kultur wurden auf Eis gekühlt und im Anschluss für 15 min bei 4.000 x g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 10 mL eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem zentrifugieren wurde das Zellsediment in 1 mL CaCl₂-Lösung resuspendiert und jeweils 50 µL aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Für die Transformation von *E. coli* nach der CaCl₂-Methode wurden die kompetenten Zellen (50 µL) für 15 min auf Eis aufgetaut und mit 3 µL des Ligationsansatzes (siehe Kap. 2.4.8) versetzt. Nach einer weiteren 30-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 s, gefolgt von einer Inkubation für 2 min auf Eis. Im Anschluss wurden 950 µL CASO-Bouillon hinzugefügt und die Suspension für 1 h bei 37 °C inkubiert. Zur positiven Selektion wurden 250 µL auf CASO-Agarplatten mit 100 µg/mL Ampicillin ausgestrichen und ü. N. bei 37 °C inkubiert.

CaCl₂-Puffer 100 mM CaCl₂
 10 % Glycerin

2.4.10 DNA-Sequenzierung

2.4.10.1 Sequenzierung von kurzen DNA-Abschnitten

Die in Vektoren klonierten Sequenzen wurden von der externen Firma GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) mit Hilfe der in Tabelle 18 angegebenen Primer nach Sanger sequenziert.

Tabelle 18: Verwendete Primer zur DNA-Sequenzierung

Primer	Sequenz (5' – 3')
pJET1.2 Fw	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
pJET1.2 Rv	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG

2.4.10.2 Sequenzierung von Phagengenomen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Phagengenom-Sequenzierungen wurden von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) unter Verwendung der SMRT[®] Technologie PacBio RS II durchgeführt. Eine Resequenzierung der Genome der Phagen JG012 und JG054 erfolgte am Institut für Genomanalytik des Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung unter Verwendung des MiSeq Sequenzierungssystems (Illumina). In Zusammenarbeit mit der DSMZ (Dr. Boyke Bunk, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) wurden die Phagengenome von JG012 und JG054 zusammengesetzt. Die mittels PacBio generierten Daten (*assembly*) lieferten jeweils einen Datensatz überlappender DNA-Fragmente (1 Contig). Eine Fehlerkorrektur, gegen den intrinsischen Insertions- und Deletionsfehler wurde durch die Zuordnung der Illumina Daten zum fertigen PacBio basierten Genom durchgeführt. Dies erfolgte unter Verwendung von BWA (*Burrows-Wheeler Alignment tool*) zum Abgleich kurzer Sequenzen gegen einer großen Referenzsequenz (Li and Durbin, 2009). Das nachfolgende Auffinden von Nukleotidunterschieden zum Referenzgenom (*variant calling*) wurde mittels der Software VarScan (Koboldt *et al.*, 2012) durchgeführt. Dabei konnte eine Konsensus Übereinstimmung von QV60 (= 99,9999 %) erreicht werden.

2.5 Bioinformatische Methoden

2.5.1 Annotation von Phagengenomen

Die Annotation der unbekannten Phagengenome erfolgte ebenfalls in Zusammenarbeit mit Dr. Boyke Bunk von der DSMZ unter Verwendung des Programms Prokka 1.8 (Seemann, 2014). Die Genome wurden nach der kleinen Untereinheit des Terminase Gens (*terS*) ausgerichtet. Zur Visualisierung und Bearbeitung der Phagengenome wurde die Software Artemis verwendet (Rutherford *et al.*, 2000). Mittels der Software *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTN) (Altschul *et al.*, 1990) und der Verwendung der *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.) konnten Sequenzhomologien zu bereits publizierten Phagen ausfindig gemacht werden. Identifizierte und in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzte kodierende Sequenzen (CDS, *coding sequences*) wurden mit bereits bekannten Proteinen unter Verwendung des *Basic Local Alignment Search Tool*, BLASTP, abgeglichen (Altschul *et al.*, 1990). Mit Hilfe des Programms tRNAscan-SE 1.21 wurde nach möglichen tRNA Genen gesucht (Lowe and Eddy, 1997). Genomvergleiche erfolgten mit Hilfe der Mauve free alignment Software (Darling *et al.*, 2010). Zur bildlichen Darstellung der Phagengenome wurde die Software DNAPlotter verwendet (Carver *et al.*, 2009). Die vollständigen Genome der Phagen JG012 und JG054 wurden in der NCBI GenBank unter der Accession Number KX898399 (JG012) und KX898400 (JG054) hinterlegt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Entwicklung eines Diagnostik-Systems zum einfachen Nachweis von lebenden *P. aeruginosa* Bakterien basierend auf Phagen

P. aeruginosa ist ein Humanpathogen, das vor allem bei immunsupprimierten Patienten schwere Infektionen auslösen kann. Dabei stellt es ein großes Problem in der Krankenhaushygiene, aber auch in der industriellen Produktion dar (siehe Kap. 1.1.3, 1.2.1). Im Krankenhaus führen Infektionen zu schweren Krankheitsverläufen, die nur schwer behandelbar sind. Zudem entstehen dadurch enorme Mehrkosten für das Gesundheitswesen. In der Industrie stellt *P. aeruginosa* ein Problem in Form von Kontaminationen von pharmazeutischen und kosmetischen Produkten sowie Nahrungsmitteln dar. Daraus resultieren zum einen wirtschaftliche Konsequenzen durch die Vernichtung von kontaminierten Produktionschargen. Zum anderen besteht eine Gefahr für den Verbraucher, wenn trotz Qualitätskontrolle kontaminierte Produkte auf den Markt gelangen. Aus diesem Grund sind eindeutige und zuverlässige Nachweismethoden von entscheidender Bedeutung. Zudem bringen Nachweismethoden, die einfach und schnell durchführbar sind den Vorteil, dass schnell Diagnosen getroffen und lange Produktionsunterbrechungen vermieden werden können. Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit ein Diagnostik-System zum einfachen Nachweis von lebenden *P. aeruginosa* Bakterien entwickelt, wobei die Detektion mit Hilfe von Phagen erfolgt. Das Prinzip dieses Diagnostik-Systems ist in der Abbildung 4 dargestellt. Es beruht auf der Erkennung von *P. aeruginosa* Bakterien durch *P. aeruginosa*-spezifische Phagen. Entsprechende Phagen mussten gefunden und charakterisiert werden. Nach der Erkennung und Lyse der Wirtszelle wurden viele neue Phagen gebildet und freigesetzt. Um die infizierenden und neu gebildeten Phagen zu unterscheiden und voneinander trennen zu können, wurden die infizierenden Phagen auf Nanopartikeln immobilisiert.

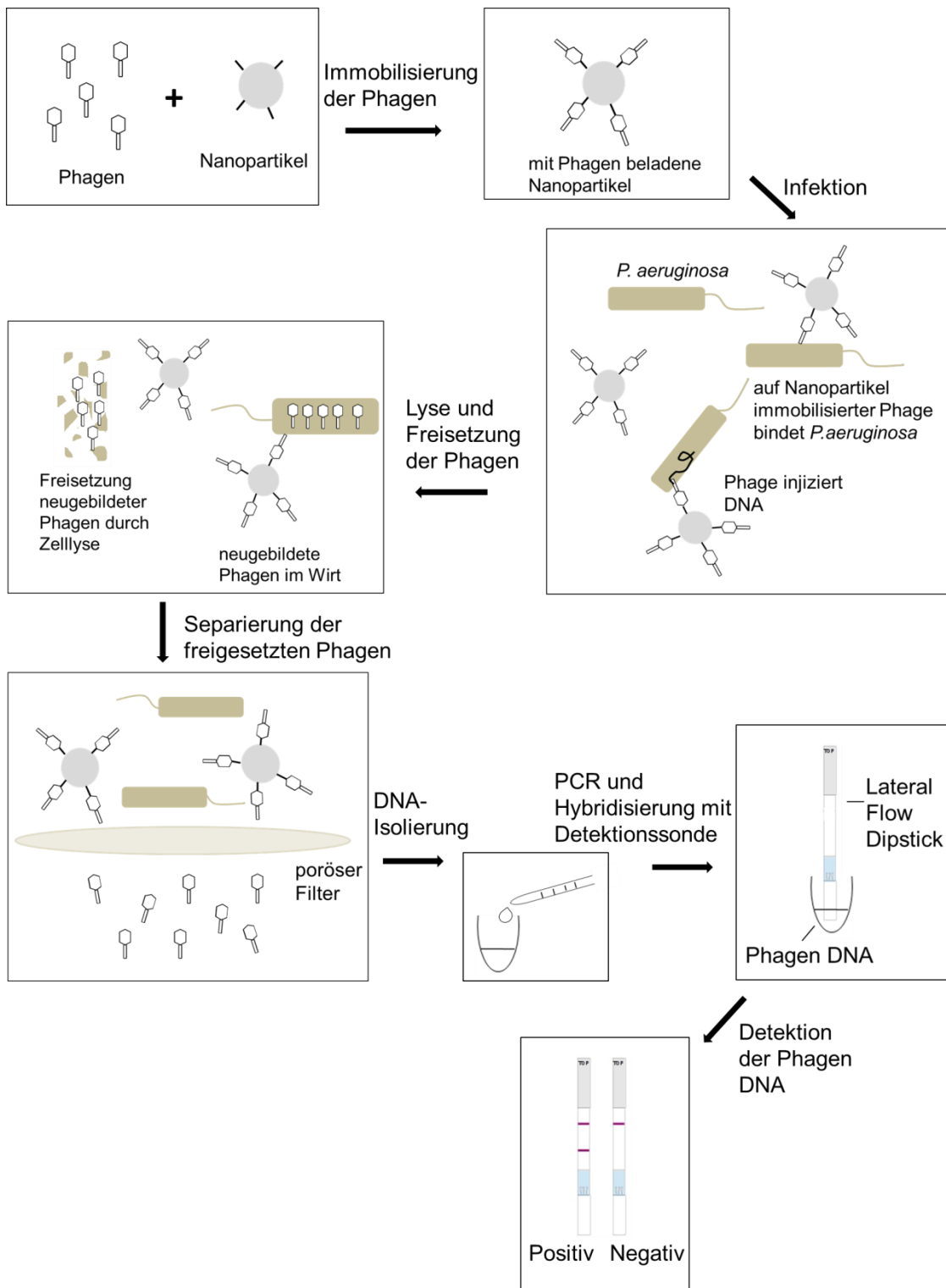


Abbildung 4: Prinzip des Diagnostik-Systems.

An Nanopartikel immobilisierte Phagen infizieren die sich in der Probe befindlichen *P. aeruginosa* Bakterien. Nach der Zellyse wird eine Vielzahl an freien, neugebildeten Phagen freigesetzt, die von der restlichen Probe mittels Filtration separiert werden. Im Anschluss wird die DNA isoliert, amplifiziert, mit Detektionssonden hybridisiert und mit Hilfe der LFD (*Lateral Flow Dipstick*) detektiert.

Im Test wurden dann die an Nanopartikel immobilisierten Phagen zur Probe gegeben. Nach der Erkennung und Infektion des Wirtes erfolgt die Replikation des Phagengenoms sowie die Assemblierung neuer Phagenpartikel, die durch die Lyse des Wirtes freigesetzt werden (vgl. Kap. 1.1). Anschließend werden die freigesetzten, nicht immobilisierten Phagen durch Filtration separiert und deren DNA isoliert, amplifiziert, mit Detektionssonden hybridisiert und mittels *Lateral Flow Dipstick* (LFD) detektiert. Eine Voraussetzung für das Funktionieren des Diagnostik-Systems war die Unterscheidung zwischen eingesetzten und neugebildeten Phagen. Denn lediglich die freigesetzten Phagen sind ein Indikator für die Präsenz von lebenden *P. aeruginosa* Bakterien in der Probe. Dies konnte durch die Immobilisierung der Phagen an magnetische Nanopartikel erreicht werden. Dazu wurde zum einen die Immobilisierbarkeit der Phagen überprüft und optimiert. Zum anderen wurde ein Protokoll entwickelt mit dem eine Vielzahl an Phagen immobilisiert und stabil gebunden werden können. Weiterhin sollten die Phagen im immobilisierten Zustand ihre Infektiosität behalten. Die Entwicklung dieses Nachweissystems für die Phagen-DNA erfolgte in Kooperation mit der Firma AMODIA Bioservice GmbH. Dabei wurde gemeinsam die DNA-Amplifizierung, Hybridisierung und die LFD Technologie angepasst. Zunächst wurde nach *P. aeruginosa*-spezifischen Phagen gesucht und diese näher charakterisiert. Im Anschluss sollten diese für die Entwicklung des Diagnostik-Systems eingesetzt werden. Die Bakterienstämme *P. aeruginosa* PAO1 DK und *P. aeruginosa* PA14 wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet. *P. aeruginosa* PAO1 wird weltweit am häufigsten in der mikrobiellen Forschung für *P. aeruginosa* als Referenzstamm verwendet. Aufgrund der jahrelangen Verwendung und Lagerung in den verschiedenen Laboren kam es zu vereinzelten Veränderungen des Genotyps. Bei *P. aeruginosa* PAO1 DK handelt es sich um einen Stamm, der weiterhin Typ-IV-Pili ausbildet (Klausen *et al.*, 2003; Klockgether *et al.*, 2010). *P. aeruginosa* PA14 ist ein häufig auftretender Keim aus der Umwelt und Klinik und somit ein geeigneter Repräsentant der Spezies *P. aeruginosa* (Wiehlmann *et al.*, 2007).

3.1.1 Selektion von Phagen

Während der Doktorarbeit von Dr. Julia Garbe (Garbe, 2010) wurde eine Vielzahl an *P. aeruginosa* Phagen aus Klärwasser isoliert. Dazu wurden die Proben mit ausgewählten *P. aeruginosa*-Stämmen inkubiert und die sich vermehrenden Phagen isoliert und anfänglich charakterisiert. Aus der daraus resultierenden institutseigenen Phagensammlung wurden 16 Phagen, die *P. aeruginosa* PA14 über Pili-Strukturen erkennen, ausgewählt und hinsichtlich einer für ihre biotechnologischen Verwendung relevanten Eigenschaften überprüft. Die lytischen Phagen sollten nach der Vermehrung mit *P. aeruginosa* PA14 (Kap. 2.2.7) einen Titer $\geq 10^9$ pfu/mL aufweisen, so dass genügend Phagenmaterial für eine Immobilisierung an Nanopartikel vorlag. Die Phagen sollten gut immobilisierbar sein ($\geq 10^5$ Phagen-Nanopartikel/mL; Kap. 2.3.1.1). Dazu wurden die Phagen an die Dynabeads® M-270 Epoxy gebunden (Kap. 2.3.1.1). Außerdem sollten die Phagen eine hohe Ausbeute an DNA liefern, so dass eine Detektion mittels LFD im Diagnostik-System möglich ist (> 500 ng aus 1 mL Phagenlysate; Kap. 2.4.2.3). Zudem wurden die 16 Phagen hinsichtlich der Infektion von *P. aeruginosa* PA14 und einer Erkennung über Pili überprüft. Eine Übersicht der Ergebnisse sind in der Tabelle 19 und Tabelle 20 dargestellt. Von den 16 analysierten Phagen zeigten die Phagen JG012, JG054 und JG057 die besten Eigenschaften für eine biotechnologische Verwendung. Diese Phagen infizieren *P. aeruginosa* PA14 über Pili-Strukturen. Die Vermehrung mit *P. aeruginosa* PA14 lieferte viele neu gebildete Phagen, die sich gut an die Dynabeads® M-270 Epoxy immobilisieren ließen. Zudem konnten hohe DNA-Ausbeuten erreicht werden.

Tabelle 19: Übersicht der Ergebnisse der Phagenselektion.

Aus der institutsinternen Phagenbank wurden 16 Phagen ausgewählt, die *P. aeruginosa* PA14 über Pili infizieren. Anschließend wurden diese Phagen mit *P. aeruginosa* PA14 vermehrt und der Phagentiter mittels Plaqueassay bestimmt (Kap. 2.2.8). Im nächsten Schritt wurden die Phagen an die Dynabeads® M-270 Epoxy immobilisiert und die Phagen-Nanopartikel-Konzentration mittels Plaqueassay bestimmt (Kap. 2.3.1.1). Zuletzt wurde die DNA aus Phagensuspensionen isoliert, die mittels PEG-Präzipitation und CsCl-Dichtegradientenzentrifugation aufkonzentriert und aufgereinigt wurden (Kap. 2.2.9).

	JG012	JG018	JG025	JG026	JG027	JG042	JG043	JG045	JG047	JG048	JG050	JG051	JG054	JG057	JG058	JG059
Vermehrung [pfu/mL]	5,0 x 10 ¹⁰	4,5 x 10 ¹⁰	-	7,5 x 10 ⁹	9,5 x 10 ⁹	-	9,5 x 10 ¹¹	6,0 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁶	1,4 x 10 ¹⁰	-	6,0 x 10 ¹¹	9,0 x 10 ¹¹	2,0 x 10 ¹⁰	4,5 x 10 ³	2,5 x 10 ²
Immobilisierung [Phagen- Nanopartikel/mL]	1,0 x 10 ¹⁰	1,1 x 10 ⁵	-	3,4 x 10 ⁷	1,3 x 10 ⁷	-	1,9 x 10 ⁸	-	-	1,6 x 10 ⁶	-	1,9 x 10 ⁶	8,2 x 10 ⁹	3,9 x 10 ⁵	-	-
DNA-Ausbeute [ng/μL]	600	7	-	18	-	-	2	-	-	117	-	382	699	516	-	-

Tabelle 20: Überprüfung der 16 Phagen auf eine Infektion von *P. aeruginosa* und *P. aeruginosa* Pili-Mutanten (Kap. 3.1.1).

Agar-Platten mit den entsprechenden *P. aeruginosa*-Stämmen und -Mutanten (Mutationen in Genen für die Typ-IV-Pili Synthese) wurden vorbereitet (Kap. 2.2.9, Tabelle 5). Auf diese Platten wurden die Phagen direkt aufgetropft, inkubiert und die Lyse der Bakterien dokumentiert (Kap. 2.2.12). (+): Infektion; (-): keine Infektion; (0): verminderte Infektion. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

<i>P. aeruginosa</i>	JG012	JG018	JG025	JG026	JG027	JG042	JG043	JG045	JG047	JG048	JG050	JG051	JG054	JG057	JG058	JG059
PAO1 DK	-	+	-	-	-	-	0	-	+	0	-	+	+	+	0	-
<i>ΔpilA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>pilR</i>::MAR2xT7	0	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	0	0	0	-	-
<i>pilM</i>::MAR2xT7	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>pilQ</i>::MAR2xT7	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>pilW</i>::MAR2xT7	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>pilT</i>::MAR2xT7	-	+	-	-	+	-	+	-	-	0	-	-	-	-	-	-

Um auszuschließen, dass diese drei Phagen bereits von anderen Forschergruppen charakterisiert wurden, wurden kurze DNA Sequenzabschnitte der Phagen Genome generiert und mit der NCBI Datenbank unter Verwendung des *Basic Local Alignment Search Tool*, BLASTX (Altschul *et al.*, 1990) verglichen. Dazu wurde zuerst die Phagen-DNA mit Restriktionsenzymen in kurze Fragmente geschnitten (Kap. 2.4.4), mittels des QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt und in das pJET1.2 Vektor-System kloniert und sequenziert (Kap. 2.4.8; 2.4.10.1). Der Sequenzvergleich zeigte, dass die Genome der Phagen JG012, JG054 und JG057 keine Homologien zu bereits publizierten Phagen aufweisen. In den folgenden Kapiteln sind die Ergebnisse deren Charakterisierung beschrieben.

3.1.2 Wirtsspektrum der Phagen JG012, JG054 und JG057

Phagen besitzen eine hohe Wirtsspezifität, wobei nur eine bestimmte Art bzw. ein bestimmter Stamm einer Art infiziert werden kann (Dorst *et al.*, 2010). Die Art *P. aeruginosa* zeichnet sich durch eine hohe physiologische und genetische Vielfalt aus (Spiers *et al.*, 2000). Das Genom setzt sich aus einem hoch konservierten und einem akzessorischen Teil zusammen. Bei dem akzessorischen Genom handelt es sich um Elemente wie z. B. genomische Inseln, die zwischen verschiedenen Stämmen ausgetauscht werden können (Spiers *et al.*, 2000; Wiehlmann *et al.*, 2007). Dieser Teil des Genoms ist verantwortlich für die beobachtete hohe Diversität innerhalb der Art *P. aeruginosa*. Durch das akzessorische Genom ist es möglich, dass unterschiedliche spezifische Proteine oder Makromoleküle, wie Lipopolysaccharide produziert werden (Spiers *et al.*, 2000). Lipopolysaccharide gehören unter anderem zu wichtigen Erkennungsstrukturen für Phagen. Aufgrund von unterschiedlich produzierten Erkennungsstrukturen ist es einem einzigen Phagen nicht möglich alle *P. aeruginosa*-Arten zu infizieren. Dr. Julia Garbe untersuchte während ihrer Diplomarbeit die Wirtsspezifität der Phagen JG012, JG054 und JG057. Dabei wurden verschiedene Bakterienisolate von CF-Patienten und Harnwegsinfektionen getestet. Die von Dr. Julia Garbe verwendeten Isolate und Wildtypen sowie die Ergebnisse des Wirtsspektrums sind in der Tabelle 21 aufgeführt.

Tabelle 21: Wirtsspektrum der Phagen JG012, JG054 und JG057.

Die Arbeiten wurden von Dr. Julia Garbe durchgeführt (Julia Garbe, Max Schobert und Dieter Jahn, unveröffentlicht). Phagensuspensionen wurden direkt auf die zu testenden Bakterienrasen aufgetropft, inkubiert und die Lyse der Bakterien dokumentiert. **(+)**: vollständige Lyse; **(-)**: keine Lyse; **(0)**: verminderte Lyse.

<i>P. aeruginosa</i> Stämme	JG012	JG054	JG057
PAO1 DK	-	+	0
PA14	+	+	+
BT2	0	+	+
BT72	+	+	+
BT73	0	0	0
RN3	0	+	+
RN43	0	+	+
RN45	0	+	+
NN84	-	-	+
PACF15	+	+	+
PACF21	-	0	0
PAKL1	-	-	-
PAKL4	-	-	-
PACF60	-	-	-
PACF61	0	+	0
PACF62	+	+	+
PACF63	0	+	+
MH 18	0	+	0
MH 19	+	0	-
MH 26	-	-	+
MH 29	+	+	+

Für den Phagen JG012 konnten ca. 67 % an getesteten infizierten *P. aeruginosa* Stämmen beobachtet werden, wobei nur 29 % vollständig lysiert wurden. Der Phage JG054 infizierte 76 % der Stämme und konnte 62 % vollständig lysieren. Der Phage JG057 konnte sogar 81 % der getesteten Stämme infizieren und lysierte 57 % vollständig. Somit sind die Phagen JG012, JG054 und JG057 in der Lage eine Vielzahl an klinischen Isolaten von CF-Patienten als auch Harnwegsinfektionen zu infizieren. Zudem können die Phagen JG054 und JG057 die getesteten Wildtypen *P. aeruginosa* PA14 und *P. aeruginosa* PAO1 DK infizieren. Bei dem Phagen JG012 konnte nur eine Infektion des *P. aeruginosa* PA14 Stammes beobachtet werden. Aufgrund des akzessorischen Genoms besitzt *P. aeruginosa* eine hohe Vielfalt innerhalb der Art. Diese äußert sich u.a. in der Diversität von Oberflächenstrukturen, die

Phagen der Erkennung des Wirtes dienen. Aufgrund dessen, dass die Erkennung des Wirtes sehr spezifisch ist kann bereits eine Modifizierung der Rezeptoren zu einer reduzierten oder zu keiner Infektion führen. Durch hohe Mutationsraten der Phagen (Drake *et al.*, 1998) kann eine schnelle Anpassung erfolgen, was wiederum zu einer hohen Wirtsspezifität der Phagen führt.

3.1.3 Bestimmung des Rezeptors zur Erkennung des Wirtes

Wie bereits im Kap. 3.1.2 gezeigt, weisen Phagen ein spezifisches Wirtsspektrum auf. Diese Spezifität wird durch die Adsorption der Phagen an den Wirt und somit der Erkennung spezifischer Rezeptoren bedingt wie z. B. Lipopolysaccharide, Proteine der äußeren Membran, Flagellen, Pili, Peptidoglycan, Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren (Rakhuba *et al.*, 2010) (Kap. 1.1). Zur Bestimmung des Rezeptors der Phagen JG012, JG054 und JG057 wurden verschiedene *P. aeruginosa* Mutanten der Pilin Biosynthese verwendet: *P. aeruginosa* PAO1 DK $\Delta pilA$, *P. aeruginosa* PA14 *pilR::MAR2xT7*, *pilM::MAR2xT7*, *pilQ::MAR2xT7*, *pilW::MAR2xT7* und *pilT::MAR2xT7* (vgl. Tabelle 5). Das *pilT* Gen kodiert für eine ATPase, die für die Retraktion der Pili benötigt wird (Chiang *et al.*, 2008). Das Gen *pilQ* kodiert für ein Protein, ein Sekretin, das einen Kanal bildet durch den Pili ausgeschleust werden (Mattick, 2002; Giltner *et al.*, 2010). PilR ist Teil des Zweikomponentensystems PilS/PilR (Sensor kinase/Regulator) und reguliert die Transkription von *pilA* (Boyd and Lory, 1996; Boyd, 2000). Das *pilA* Gen kodiert für Pilin-Untereinheiten (Boyd and Lory, 1996). PilW ist Teil des *minor pilins*, das an der Assemblierung der Piline beteiligt ist (Giltner *et al.*, 2010). Das Gencluster *pilM/N/O/P/Q* gehört zu der Hauptgruppe an Genen, die an der Biogenese der Typ-IV-Pili beteiligt sind (Ayers *et al.*, 2009). Die Bestimmung der Spezifität der Phagen erfolgte durch das direkte Auftropfen der Phagen auf die entsprechenden Bakterienrasen der *P. aeruginosa* Pilin Biosynthese Mutanten (Kap. 2.2.12). Nach erfolgter Inkubation wurde überprüft, ob die Bakterien lysiert und somit infiziert wurden. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 22 zusammengefasst. Für die Phagen JG012, JG054 und JG057 konnte keine Lyse der Pili-Mutanten beobachtet werden. Die *P. aeruginosa* PA14 *pilR::MAR2xT7* Mutante zeigte eine

verminderte Lyse durch die drei Phagen. Der Wildtyp *P. aeruginosa* PA14 wurde von allen drei Phagen und der Wildtyp *P. aeruginosa* PAO1 DK von den Phagen JG054 und JG057 lysiert. Somit konnten die Phagen JG012, JG054 und JG057 die verschiedenen *P. aeruginosa*-Pili-Mutanten, die eine Ausbildung der Pili verhindern, nicht infizieren. Die verminderte Infektion von *P. aeruginosa* PA14 *pilR*::MAR2xT7 lässt vermuten, dass die vorliegende Mutation nur eine Reduktion der Pili-Biogenese zur Folge hat. Aufgrund der reduzierten exprimierten Pili ist nur eine verringerte Infektion möglich. Schlussfolgernd erkennen und infizieren die Phagen JG012, JG054 und JG057 *P. aeruginosa* über dessen Pili-Strukturen.

Tabelle 22: Bestimmung möglicher Rezeptoren der Phagen JG012, JG054 und JG057.

Agar-Platten mit den entsprechenden *P. aeruginosa*-Stämmen und –Mutanten (Mutationen in Genen für die Typ-IV-Pili Synthese) wurden vorbereitet (Kap. 2.2.9, Tabelle 5). Auf diese Platten wurden die Phagen direkt aufgetropft, inkubiert und die Lyse der Bakterien dokumentiert (Kap. 2.2.12). **(+)**: Infektion; **(-)**: keine Infektion; **(0)**: verminderte Infektion. Dargestellt sind die Ergebnisse aus sechs unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

<i>P. aeruginosa</i>	JG012	JG054	JG057
PAO1 DK	-	+	+
$\Delta pilA$	-	-	-
PA14	+	+	+
<i>pilR</i> ::MAR2xT7	0	0	0
<i>pilM</i> ::MAR2xT7	-	-	-
<i>pilQ</i> ::MAR2xT7	-	-	-
<i>pilW</i> ::MAR2xT7	-	-	-
<i>pilT</i> ::MAR2xT7	-	-	-

3.1.4 Art der Nukleinsäure

Zur Bestimmung des Erbguttyps (ss oder dsDNA) wurde die DNA der Phagen JG012, JG054 und JG057 mit Restriktionsenzymen geschnitten (Kap. 2.4.4). Es wurden Restriktionsenzyme verwendet, die dsDNA hydrolysieren und eindeutig identifizieren. Die verwendeten Enzyme sowie die Ergebnisse sind in der Tabelle 23 zusammengefasst.

Tabelle 23: Restriktion der Phagen-DNA mit Restriktionsenzymen.

Die Hydrolyse der Phagen-DNA erfolgte mit Restriktionsenzymen, die nur dsDNA hydrolysieren (Kap. 2.4.4). (+): Restriktion der DNA; (-): keine Restriktion; (/): nicht getestet.

Enzym	JG012		JG054		JG057	
	Ja	Nein	Ja	Nein	Ja	Nein
<i>AfeI</i>	+	-	+	-	+	-
<i>BsaAI</i>	+	-	-	+	+	-
<i>BsaBI</i>	-	+	/	/	/	/
<i>BsrBI</i>	-	+	/	/	/	/
<i>BstZ17I</i>	-	+	-	+	/	/
<i>DpnI</i>	-	+	-	+	-	+
<i>EarI</i>	-	+	/	/	+	-
<i>EcoRV</i>	-	+	/	/	+	-
<i>HincII</i>	-	+	-	+	/	/
<i>MboII</i>	-	+	/	/	+	-
<i>NaeI</i>	-	+	/	/	+	-
<i>PvuII</i>	/	/	/	/	+	-
<i>SapI</i>	-	+	/	/	/	/
<i>SfoI</i>	-	+	-	+	+	-
<i>SmaI</i>	-	+	/	/	/	/
<i>SspI</i>	-	+	-	+	+	-
<i>StuI</i>	-	+	-	+	+	-

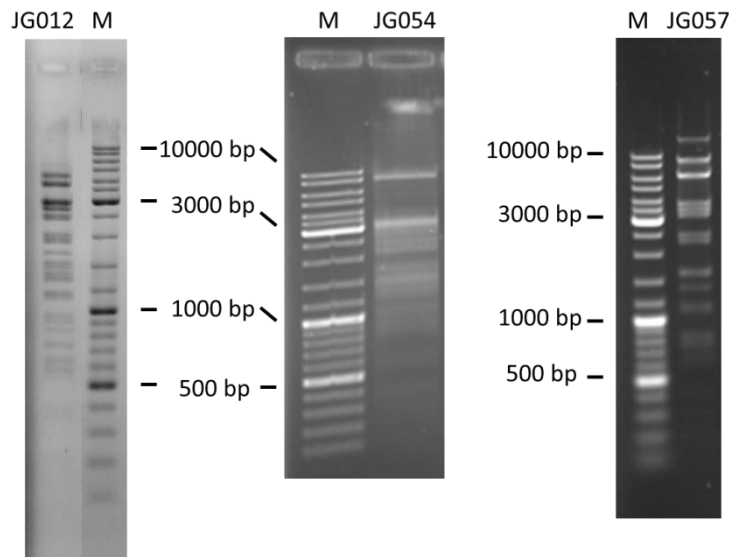


Abbildung 5: Restriktion der DNA der Phagen JG012, JG054 und JG057 mit dem Enzym *AfeI*.

Die Restriktion der Phagen-DNA erfolgte mit dem Restriktionsenzym *AfeI* (Kap. 2.4.4). Zur Visualisierung wurde die DNA elektrophoretisch in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. In Spur M wurde der Längenstandard GeneRuler™ DNA Ladder Mix aufgetragen. Dabei zeigten sich bei jedem Phagen unterschiedliche Bandenmuster.

Der Phage JG012 wurde von den Enzymen *AfeI* und *BsaAI*, der Phage JG054 von dem Enzym *AfeI* und der Phage JG057 ebenfalls von dem Enzym *AfeI* und einer Vielzahl weiterer getesteter Enzyme hydrolysiert. Weiterhin zeigte das DNA-Bandenmuster der Restriktionsanalyse der drei Phagen mit dem Enzym *AfeI* Unterschiede bezüglich der Anzahl und Größe der Banden (Abbildung 5). Somit handelt es sich bei der Nukleinsäure der drei Phagen zuerst einmal um dsDNA. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es sich um nicht identische Phagen handelt. Dies äußert sich zum einen in der diversen Anzahl an schneidenden Enzymen sowie im unterschiedlichen Bandenmuster desselben Enzyms. Restriktionsschnittstellen im Phagengenom sind mögliche Angriffspunkte für die Verteidigung von Bakterien. Durch von Bakterien exprimierten Restriktionsenzymen kann injizierte Phagen-DNA erkannt und hydrolysiert werden. Aufgrund dessen haben Phagen Strategien entwickelt um diesem Abwehr-Mechanismus zu umgehen. Die DNA kann u.a. durch Methylierungen oder Punktmutationen geschützt werden, so dass eine Erkennung durch Restriktionsenzyme verhindert wird. Eine Möglichkeit ist die Wirt-gesteuerte Modifizierung. Normalerweise erfolgt während der Replikation bakterieller DNA eine Methylierung spezifischer Sequenzen, die durch das eigene Abwehrsystem erkannt werden könnten. Durch die Umprogrammierung des Wirt-Metabolismus wird anstelle des Wirtgenoms das Phagengenom repliziert und ebenso an spezifischen Sequenzen, die durch das Abwehrsystem vom Wirt erkannt werden, methyliert. Resultierend sind die Phagen gegen entsprechende Abwehrmechanismen resistent (Krüger and Bickle, 1983; Shabbir *et al.*, 2016). Dies erklärt zudem die Tatsache, dass durch bioinformatische Methoden detektierte Restriktionsschnittstellen im Genom trotzdem zu keiner Hydrolyse der DNA führen (Kulikov *et al.*, 2014). Somit kann anhand von unterschiedlichen Restriktionsschnittstellen zwischen verschiedenen Phagen unterschieden und Hinweise auf unterschiedliche Abwehrmechanismen von ähnlichen Phagen gefunden werden.

3.1.5 Morphologie und Klassifizierung

Phagen werden anhand der Art ihrer Nukleinsäure und ihrer Morphologie klassifiziert. Eine Übersicht über die verschiedenen Morphotypen, anhand derer die Zuordnung einer Familie erfolgt, ist in der Tabelle 1 (Kap. 1.1) dargestellt. Zur Bestimmung der Morphologie der Phagen JG012, JG054 und JG057 wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt (Abbildung 6, Kap. 2.2.11).

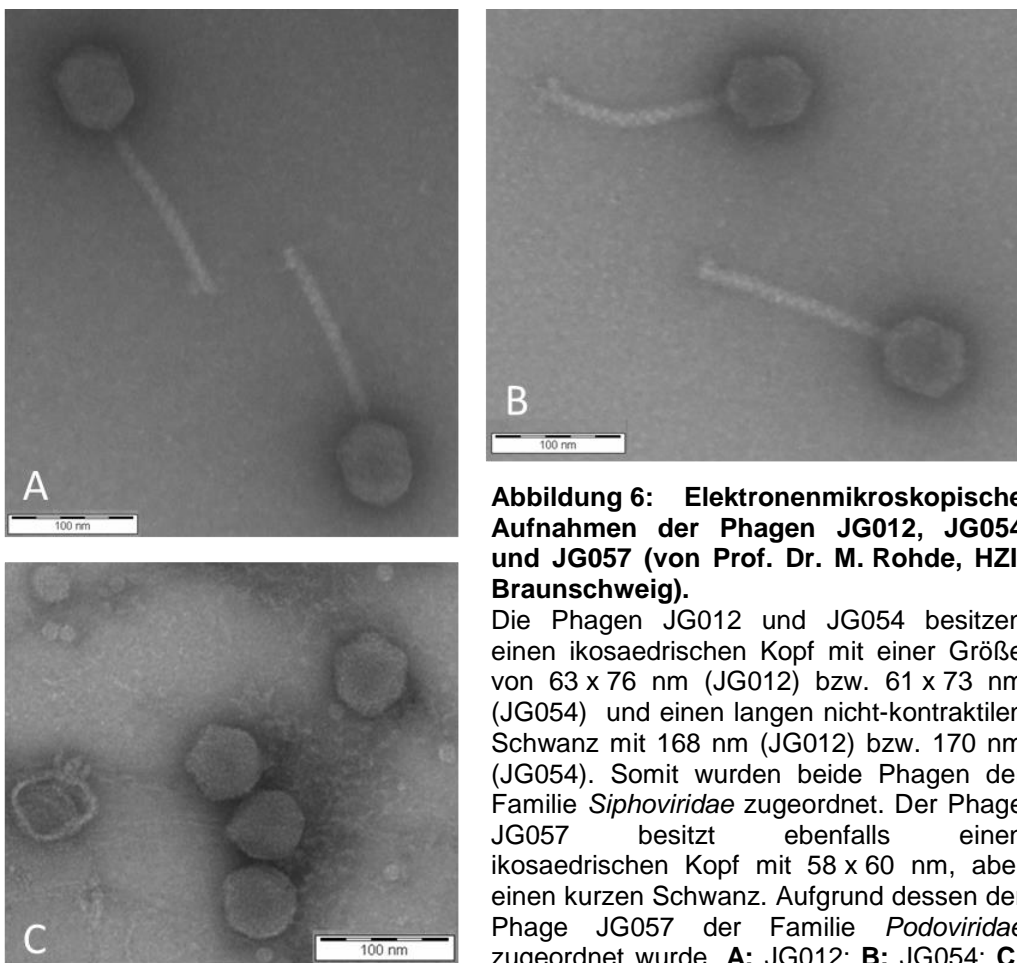


Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Phagen JG012, JG054 und JG057 (von Prof. Dr. M. Rohde, HZI, Braunschweig).

Die Phagen JG012 und JG054 besitzen einen ikosaedrischen Kopf mit einer Größe von 63 x 76 nm (JG012) bzw. 61 x 73 nm (JG054) und einen langen nicht-kontraktilen Schwanz mit 168 nm (JG012) bzw. 170 nm (JG054). Somit wurden beide Phagen der Familie *Siphoviridae* zugeordnet. Der Phage JG057 besitzt ebenfalls einen ikosaedrischen Kopf mit 58 x 60 nm, aber einen kurzen Schwanz. Aufgrund dessen der Phage JG057 der Familie *Podoviridae* zugeordnet wurde. **A:** JG012; **B:** JG054; **C:**

Die Bilder A und B zeigen die Phagen JG012 und JG054 mit einem ikosaedrischen Kopf sowie einem langen nicht-kontraktilen Schwanz. Der Kopf weist eine Größe von 63 x 76 nm (JG012) bzw. 61 x 73 nm (JG054) auf und der Schwanz ist 168 nm (JG012) bzw. 170 nm (JG054) lang. Aufgrund dessen und der identifizierten Art der Nukleinsäure, dsDNA, können die Phagen JG012 und JG054 der Familie *Siphoviridae* zugeordnet werden (vgl. Tabelle 1, Kap. 1.1).

Der Phage JG057 (Abbildung 6 C) weist ebenfalls einen ikosaedrischen Kopf (58 x 60 nm) auf, aber nur einen sehr kurzen Schwanz. Somit und auf Grund der identifizierten dsDNA, kann der Phage JG057 der Familie *Podoviridae* zugeordnet werden (vgl. Tabelle 1, Kap. 1.1). Neben den *Siphoviridae* und *Podoviridae* gibt es eine weitere Familie von Phagen mit einer Kopf-Schwanz-Morphologie, den *Myoviridae*. Dieser Familie werden Phagen mit kontraktilem Schwanz zugeordnet. Zusammen bilden diese drei Familien die größte Gruppe an Phagen mit 96 %, die *Caudovirales* (Ackermann 2011, vgl. Kap. 1.1).

3.1.6 Wachstumseigenschaften

Zur Bestimmung von Wachstumseigenschaften von Phagen werden Einschnitt-Wachstumstests (*one-step growth curves*) durchgeführt. Damit können verschiedene Parameter eines Infektionszyklus von Phagen bestimmt werden. Dazu zählen u.a. die Dauer einer Infektion, die Zeit von der Adsorption bis zur Freisetzung der ersten Phagen (Latenzphase) und der Anzahl an freigesetzten Phagen pro Bakterienzelle (*burst size*) (Hyman and Abedon, 2009). In der Abbildung 7 sind die sogenannten *one-step growth curves* der Phagen JG012 (Schwarz), JG054 (Grün) und JG057 (Rot) dargestellt (Kap. 2.2.13). Dazu wurden konstante Bedingungen gewählt, unter denen *P. aeruginosa* PA14 mit hoher Wahrscheinlichkeit nur von einem Phagen infiziert wurde (MOI = 0,01) und *P. aeruginosa* PA14 metabolisch aktiv war, so dass in kurzer Zeit neue Phagen gebildet werden konnten (*P. aeruginosa* PA14 in exponentieller Wachstumsphase). Weiterhin erfolgte nach kurzer Vorinkubation der Phagen mit *P. aeruginosa* PA14, im kleinen Volumen, eine logarithmische Verdünnung, so dass eine Adsorption unwahrscheinlich wurde. Zudem sollten in einer Verdünnungsstufe Bedingungen vorliegen, in der es zu keiner Neuinfektion der freigesetzten Phagen kommen konnte. Unter diesen Bedingungen war es möglich die einzelnen Phasen einer Infektion der Phagen JG012, JG054 und JG057 zu bestimmen.

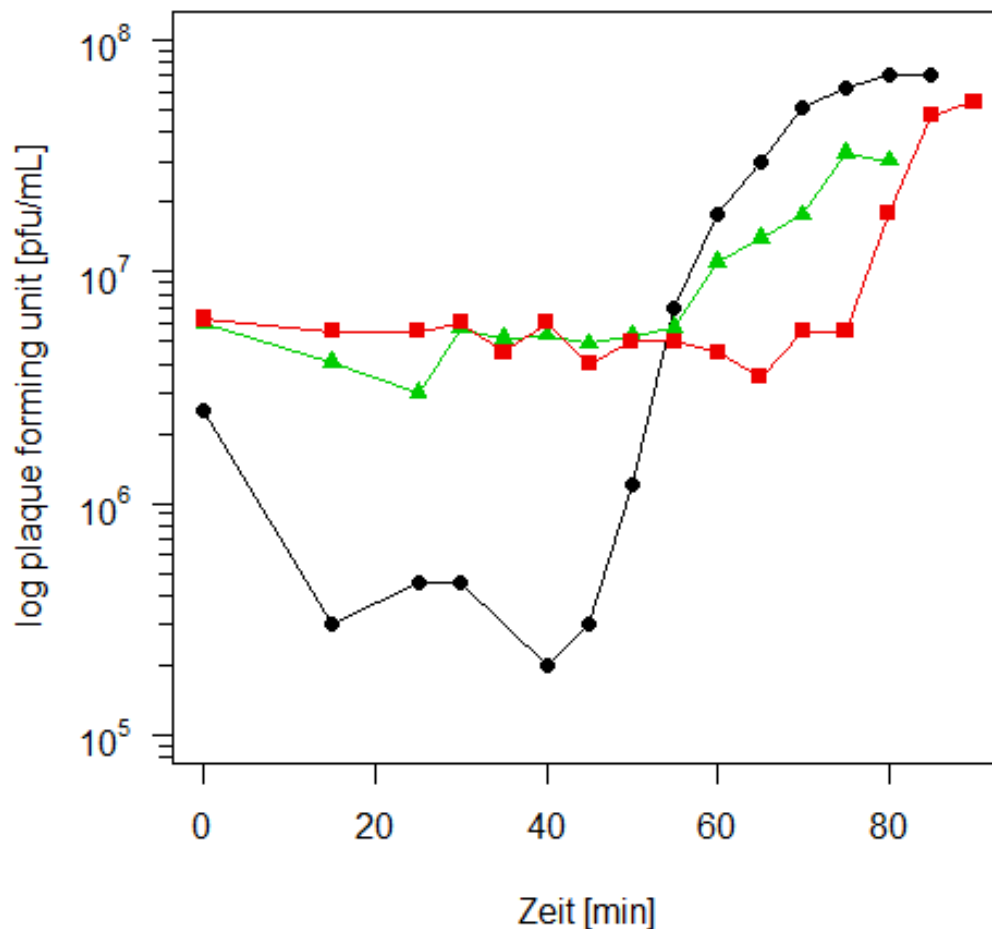


Abbildung 7: Sogenannte *one-step growth curves* der Phagen JG012, JG054 und JG057. Die Phagen und *P. aeruginosa* PA14 wurden mit einer MOI = 0,01 inkubiert. Nach 15 minütiger Vorinkubation erfolgte eine logarithmische Verdünnung, die weiterhin bei 37 °C inkubiert wurde (Kap. 2.2.13). Die Probenahme erfolgte alle 5 min mit anschließender Titerbestimmung (Kap. 2.2.9). **Schwarz:** JG012; **Grün:** JG054; **Rot:** JG057. Dargestellt sind die Ergebnisse eines Experiments. Die Darstellung erfolgte mit der Software R (siehe Anhang; R Core Team 2016).

Für den Phagen JG012 konnte zu Beginn des Infektionsverlaufs eine Abnahme des Phagentiters beobachtet werden (Abbildung 7 Schwarz). Dabei adsorbieren die Phagen über spezifische Rezeptoren (Pili, vgl. Kap. 3.1.3) an *P. aeruginosa* PA14 und injizieren ihre Nukleinsäure. Im Anschluss erfolgt die Replikation des Phagen-genoms sowie die Synthese struktureller Proteine durch den Replikationsapparat des Wirtes. Nach der Assemblierung der reifen Phagenpartikel wird die Wirtszelle lysiert und die neugebildeten Phagen freigesetzt (Weinbauer, 2004). Für den Phagen JG012 wird dies durch den plötzlichen Anstieg des Phagentiters nach ca. 40 min deutlich und erreicht sein Maximum nach ca. 80 min. Somit konnte für den Phagen JG012 die Dauer

eines Infektionszyklus von ca. 80 min, eine Latenzphase von 40 min und eine daraus resultierende Vermehrungsfrequenz (*burst size*) von ca. 27 Phagen pro *P. aeruginosa* PA14-Bakterium bestimmt werden. Die sogenannte *burst size* ermittelt sich mittels folgender Formel:

$$\frac{\text{Plateau der freigesetzten Phagen}}{(\text{Anfangstiter-Titer nach Phagenadsorption})} = \text{Zahl freigesetzter Phagen pro Bakterienzelle}$$

Für den Phagen JG054 (Grün) konnte eine Dauer des Infektionszyklus von ca. 75 min bestimmt werden. Die Latenzphase betrug ca. 55 min und die sogenannte *burst size* ca. 11 Phagen pro *P. aeruginosa* PA14-Bakterium. Für den Phagen JG057 konnte die längste Latenzphase von ca. 65 min sowie der Dauer eines Infektionszyklus von ca. 85 min ermittelt werden. Die sogenannte *burst size* betrug ca. 17 Phagen pro *P. aeruginosa* PA14-Bakterium. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Infektionsparameter der Phagen ist in der Tabelle 24 dargestellt. Somit konnte ein unterschiedlicher Infektionsverlauf der drei Phagen untereinander gezeigt werden, was zudem auf nicht-identische Phagen hindeutet. Bei Untersuchungen der einzelnen Phasen einer Phageninfektion konnte u.a. bereits gezeigt werden, dass die Latenzphase mit der sogenannten *burst size* korreliert. Je länger die Latenzphase desto größer die sogenannte *burst size*, da mehr Phagen gebildet werden können. Jedoch konnte beobachtet werden, dass Phagen eher eine mittlere Latenzphase aufweisen, wobei eine höhere Wachstumsrate vorliegt auch wenn dadurch die sogenannte *burst size* geringer ausfällt. Zudem verhindert eine zu lange Latenzphase die Möglichkeit viele neue Infektionen zu initiieren. Durch die Infektion mehrerer Wirte kann im Umkehrschluss ein höherer Gesamtiter an freigesetzten Phagen erzielt werden. Aufgrund von evolutionären Prozessen, auch in Abhängigkeit vom Wirt in Bezug auf u.a. Populationsdichten in der Umgebung der Phagen sowie der Vermehrungsrate innerhalb des Wirtes, weisen Phagen spezifische, angepasste Infektionsverläufe auf (Wang, 2006; Shao and Wang, 2008). Beim Vergleich der Phagen JG054 und JG057, zeigte der Phage JG057 eine längere Latenzphase und somit eine größere sogenannte *burst size*, was im Einklang mit den Beobachtungen von Wang

(2006) steht. Bei dem Phagen JG012 hingegen konnte trotz einer geringeren Latenzphase im Vergleich zu den Phagen JG054 und JG057 eine höhere sogenannte *burst size* beobachtet werden. Dies könnte auf eine effektivere Vermehrungsrate der Phagen zurückzuführen sein. Demnach könnte eine frühere Lyse der Zelle und somit eine schnellere Infektion weiterer Wirtszellen einen Vorteil in der Evolution gezeigt haben.

Tabelle 24: Parameter einer Infektion der Phagen JG012, JG054 und JG057.

*Mittelwert \pm Standardabweichung aus sieben unabhängigen Experimenten.

Phage	Dauer einer Infektion	Latenzphase	Phagen/Zelle
JG012 *	74 \pm 8 min	46 \pm 6 min	27 \pm 14
JG054	75 min	55 min	11
JG057	85 min	65 min	17

3.1.7 Isolierung hochreiner Phagen-DNA

Für die Sequenzierung der Phagengenome sollte hochreine, nicht degradierte DNA in ausreichenden Mengen gewonnen werden. Absorptionsmessungen bieten die Möglichkeit die Reinheit der DNA zu überprüfen. Dabei sollte das Absorptionsverhältnis von 260 nm und 280 nm $\geq 1,8$ liegen. Werte darunter sind ein Zeichen für Verunreinigungen z. B. mit Proteinen und/oder Phenol. Ein weiteres Indiz für die Reinheit der DNA ist das Absorptionsverhältnis 260/230, das $\geq 1,9$ betragen sollte. Kontaminanten, die bei einer Wellenlänge von 230 nm absorbieren, sind u.a. EDTA, Phenol oder Guanidinhydrochlorid, das häufig zur Isolierung von DNA verwendet wird. Basierend auf einer Methodensammlung von Pickard (2009) wurde ein Protokoll zur Isolierung von hochreiner Phagen-DNA etabliert. Dabei erfolgte ein schrittweiser Aufbau des Protokolls. Mittels einer enzymatischen Hydrolyse wurde mögliche in der Phagensuspension enthaltende DNA und RNA von *P. aeruginosa* degradiert. Ohne diese Behandlung könnte neben Phagen-DNA auch *P. aeruginosa*-DNA isoliert und anschließend sequenziert werden, was zu falschen Ergebnissen führen würde. Die Phagensuspensionen wurden mit DNase I, RNase A und $MgCl_2$ inkubiert. Zur Identifizierung der optimalen Bedingungen der enzymatischen Hydrolyse wurden verschiedene Konzentrationen und

Inkubationszeiten getestet (Kap. 2.4.2.1). Dabei zeigten eine Endkonzentration von 500 µg/mL an DNase I und RNase A sowie 10 mM MgCl₂ bei einer Inkubation für 1 h bei 37 °C eine vollständige Restriktion bakterieller DNA. Zur Überprüfung der vollständigen Restriktion der *P. aeruginosa*-DNA wurde eine PCR durchgeführt. Dazu wurden *P. aeruginosa*-spezifische Primer eingesetzt, die noch vorhandene *P. aeruginosa*-DNA nachweisen können (Kap. 2.4.6). Nach erfolgreicher Restriktion der DNA (kein Produkt durch PCR nachweisbar) erfolgte eine Aufkonzentrierung der Phagenprobe. Dieser Schritt wurde durchgeführt, da der geringe Titer der Phagensuspensionen (ca. 10¹⁰ pfu/mL) ohne Aufkonzentrierung in einer geringen DNA-Menge resultierte. Aufgrund dessen wurden bis zu 80 mL an Phagensuspensionen eingesetzt und mit einer Fällungslösung im Verhältnis 1:5 aufkonzentriert. Dazu wurden verschiedene Inkubationsbedingungen getestet: -20 °C für mind. 16 h und auf Eis für ca. 1 h. Dabei konnten keine Unterschiede bezüglich der Effizienz der Aufkonzentrierung beobachtet werden, da vermutlich bereits nach 1 h das gesamte Phagenmaterial präzipitierte. Aufgrund dessen erfolgte die Aufkonzentrierung für 1 h auf Eis. Zur Inaktivierung noch vorhandener DNase I als auch zum Aufschluss der Phagen erfolgte im Anschluss eine Inkubation mit 0,5 mg/mL (Endkonzentration) Proteinase K und 0,5 % (Endkonzentration) SDS für ca. 1 h bei 56 °C (Kap. 2.4.2.1). Zur Aufreinigung der Phagen-DNA wurden verschiedene Protokolle und Kits einzeln als auch in Kombination getestet und optimiert. Aufgrund dessen, dass keine Kits zur Isolierung von Phagen-DNA bezogen werden konnten wurden QIAprep Spin Miniprep Kit und DNeasy® Blood & Tissue Kit von Qiagen getestet (Kap. 2.4.2.2). Das QIAprep Spin Miniprep Kit ist geeignet um u.a. große Plasmide > 10 kb zu isolieren und erzielte bereits sehr gute Ergebnisse bei der Präparation von Plasmiden (Kap. 2.4.1). Das DNeasy® Blood & Tissue Kit wurde aufgrund der breiten Anwendbarkeit an verschiedenen Proben sowie der Isolierung von großen DNA-Fragmenten gewählt. Dabei erfolgten Modifizierungen bezüglich der Wahl des Waschpuffers sowie der Häufigkeit und Inkubationszeit der Waschschrte. Weiterhin wurden Änderungen bezüglich des Elutionsvolumens, -puffers und der Temperatur des Elutionspuffers vorgenommen. Aufgrund dieser Optimierungen konnten Verbesserungen der Reinheit erzielt werden. Jedoch

wiesen die Proben weiterhin Degradierungen auf, die durch den Auftrag der DNA auf Agarosegelen nachgewiesen werden konnten (Kap. 2.4.3). Durch die Anwendung des QIAEX II Gel Extraction Kit von Qiagen, wobei nicht degradierte DNA aus Agarosegelen ausgeschnitten und aufgereinigt wurde, konnte keine Verbesserung erzielt werden (Kap. 2.4.2.2). Der Grund hierfür lag in dem sehr hohen Verlust der DNA während der Aufreinigung. Weiterhin wurde die klassische Methode der Phenol-Chloroform-Extraktion angewendet (Kap. 2.4.2.2). Dabei erfolgten Modifizierungen bezüglich der Häufigkeit der Extraktion mit Phenol/Chloroform bzw. Chloroform und der Art der Extraktion: vorsichtiges invertieren oder kräftiges Schütteln der Probe und die Dauer des Invertierens wurde variiert. Weiterhin wurde diese Extraktion zum einen mit der anschließenden Aufreinigung der Qiagen Kits kombiniert. Zum anderen die DNA direkt im Anschluss gefällt, wobei verschiedene Reagenzien getestet wurden (Kap. 2.4.2.2). Dabei zeigte die alleinige Anwendung der Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung (mit Natriumacetat) die besten Ergebnisse mit einer sehr hohen Ausbeute an reiner und nicht degradierter DNA. Die Degradierungen, die bei der Verwendung der Säulen-basierten Isolierungskits beobachtet wurden könnten aufgrund von zu hohen Scherkräften aufgetreten sein. Es wäre möglich, dass die Säulenstruktur und die Zentrifugationsschritte zu große Kräfte auf die DNA ausüben, so dass es zur Fragmentierung der genomischen DNA kommt. Dahingegen zeigte sich die klassische Phenol-Chloroform-Extraktion als eine schonendere Methode zur Isolierung von genomischer Phagen-DNA. Es konnten Mengen $\geq 50 \mu\text{g}$ und Extinktionsverhältnisse von $260/280 \geq 1,8$ und $260/230 \geq 1,6$ erreicht werden. Eine Vereinfachung der Phenol-Chloroform-Extraktion konnte mit dem Isolierungskit Phase Lock Gel[™] (PLG) von 5 Prime erzielt werden (Kap. 2.4.2.2). Weiterhin konnte während der Optimierung beobachtet werden, dass frische Phagensuspensionen, die nicht älter als eine Woche waren, DNA in besserer Qualität/Reinheit lieferten. Das final etablierte Protokoll zur Isolierung von Phagen-DNA ist in dem Kap. 2.4.2.3 aufgeführt.

3.1.8 Bestimmung der Phagen genomstruktur

Eine Methode, um Hinweise auf lineare oder zirkuläre Genome zu bekommen, ist die Restriktion mit der Exonuklease *Bal31*. Dieses Enzym baut nur lineare dsDNA simultan von beiden Enden ab und ist somit ein Indikator für ein lineares Genom. Dazu wurde die DNA mit dem Enzym inkubiert und die Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten abgestoppt (Kap. 2.4.5). Dadurch soll der schrittweise Abbau der DNA nachvollzogen werden. Im Anschluss erfolgte eine weitere Restriktion der DNA mit einer Endonuklease, welche die DNA in mehrere Fragmente zerteilt. Erst dadurch kann ein möglicher Abbau der genomischen Enden beobachtet werden. Die visuelle Darstellung erfolgte durch die elektrophoretische Auftrennung der DNA. Durch den Abbau der Genomenden sinkt die Konzentration zweier Banden der fragmentierten DNA. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 8 dargestellt.

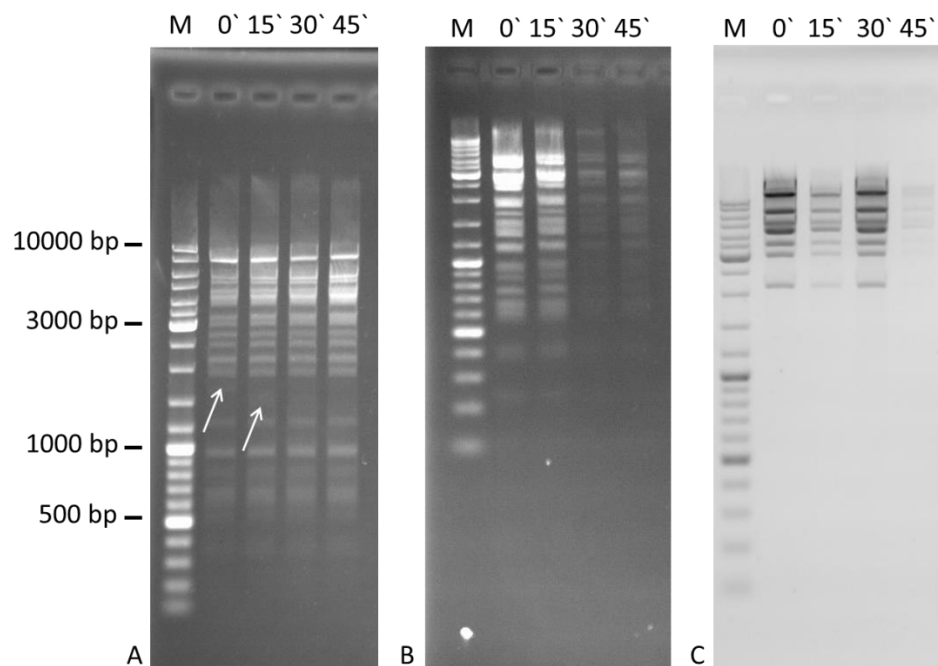


Abbildung 8: Restriktion genomischer Phagen-DNA mit der Exonuklease *Bal31* zur Bestimmung linearer Genome. Die Inkubation der Phagen-DNA erfolgte für 0 min, 15 min, 30 min und 45 min mit dem Enzym *Bal31* bei 30 °C. Im Anschluss wurde die Reaktion mit 20 mM EGTA gestoppt, die DNA mittels Ethanol gefällt und mit einer Restriktionsendonuklease erneut hydrolysiert. Dargestellt ist die elektrophoretische Auftrennung der DNA (1 % Agarosegel) (Kap. 2.4.3). In Spur M wurde der Längenstandard GeneRuler™ DNA Ladder Mix aufgetragen. **A:** JG054, **B:** JG012, **C:** JG057. **Pfeil:** Abbau der Banden.

Für den Phagen JG054 (Abbildung 8 A) konnte der Abbau einer Bande durch *Ba/31* beobachtet werden (siehe Pfeil). Dies deutet daraufhin, dass das Genom von JG054 linear ist. Für den Phagen JG012 (Abbildung 8 B) konnte kein Abbau einzelner Banden durch *Ba/31* detektiert werden. Über die Zeit konnte eine Abnahme der gesamten DNA-Konzentration beobachtet werden. Das deutet daraufhin, dass das Genom von JG012 zirkulär permutiert ist (Loessner *et al.*, 2000). Es gibt verschiedene Verpackungsmechanismen unter Phagen. Bei λ -Phagen z. B. wird das Genom an spezifischen Erkennungssequenzen geschnitten und somit immer gleiche DNA-Moleküle in die Phagenköpfe verpackt. Bei T4-Phagen hingegen wird der Phagenkopf solange mit DNA gefüllt bis dieser „voll“ ist („*head-full*“-Mechanismus). Das bedeutet, dass während der Replikation und der Konkatemerbildung das gesamte Genom verpackt wird plus einen weiteren Teil desselben Genoms. Danach wird die DNA geschnitten und ab dieser Stelle weiter in Phagenköpfe verpackt. Am Ende haben alle Phagen unterschiedliche DNA-Moleküle, aber mit dem gleichen Geninhalt. So entstehen lineare Genome die zirkulär permutiert sind. Demzufolge liegen verschiedene Genomenden vor, die von dem Enzym *Ba/31* abgebaut werden. Schlussfolgernd nimmt nicht die Konzentration einer bestimmten Sequenz ab, sondern verschiedener Sequenzen. Deshalb kann eine Abnahme der gesamten DNA-Konzentration beobachtet werden (Pan and Uhlenbeck, 1993; Loessner *et al.*, 2000; Kutter *et al.*, 2005). Für den Phagen JG057 (Abbildung 8 C) konnte kein eindeutiges Resultat erhalten werden. Es konnte weder eine Abnahme einer distinkten Bande noch eine Abnahme der Konzentration der gesamten DNA beobachtet werden. Folglich könnte JG057 ein zirkuläres Genom besitzen. Jedoch konnte eine Abnahme der Konzentration der gesamten DNA nach 45 min beobachtet werden, die aber nicht kontinuierlich über die verschiedenen Zeitpunkte zu beobachten war. Somit könnte das Genom von JG057 auch zirkulär permutiert sein. Zusammenfassend konnte für die Phagen JG012 und JG054 ein lineares Genom identifiziert werden, wobei das lineare Genom von JG012 zirkulär permutiert ist. Für den Phagen JG057 konnte kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden.

3.1.9 Genomsequenzierung und Annotation

Genomsequenzierungen ermöglichen u.a. einen Einblick in die Mechanismen der Replikation und Maturation der Phagen auf genetischer Ebene. Für welche Proteine kodiert das Genom des Phagen und wofür nutzt es den Wirt. Zudem geben Genomsequenzierungen Aufschluss über u.a. mögliche Toxin-kodierende Sequenzen, so dass eine Einschätzung für die mögliche Anwendung von Phagen erfolgen kann. Dahingehend ob beispielsweise ein Einsatz in der Phagen-Therapie möglich ist. Die Genomsequenzierungen wurden unter Verwendung der SMRT[®] Technologie PacBio RS II (GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Aufgrund schlechter Sequenzqualitäten und fehlerhaften Fragmenten der Phagen JG012 und JG054 erfolgte eine Resequenzierung mittels Illumina Technologie (HZI, Braunschweig, Deutschland). In Zusammenarbeit mit Dr. Boyke Bunk (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) erfolgte die Fehlerkorrektur der Phagen JG012 und JG054 sowie die erste Annotation der drei Phagengenome (Kap. 2.4.10.2, 2.5.1). Bestehende Sequenzhomologien zu veröffentlichten Phagengenomen bzw. Homologien zu identifizierten Proteinen wurden unter Verwendung von BLASTN bzw. BLASTP (Altschul *et al.*, 1990) identifiziert. Zur Visualisierung, Auswertung und Bearbeitung der Phagengenome wurde die Software Artemis verwendet (Rutherford *et al.*, 2000). Im Folgenden ist die detaillierte Annotation der Phagen JG012, JG054 und JG057 aufgeführt.

3.1.9.1 *P. aeruginosa* Phagen JG012 und JG054

Der Phage JG012 umfasst eine Genomgröße von 58.359 bp mit einem GC-Gehalt von 58,7 %. *P. aeruginosa* PA14 weist einen GC-Gehalt von 66,3 % auf (Shin *et al.*, 2008). Damit ist der GC-Gehalt des Phagen geringer als der des Wirtes. Dieser Unterschied im GC-Gehalt zwischen Phage und Wirt ist ungewöhnlich und steht im Kontrast zu Beobachtungen aus anderen Studien. Es konnte u.a. für *S. aureus* ein GC-Gehalt des Phagen von 33,7 % und des Wirtes von 32,9 % beobachtet werden. Bei *Mycobacterium tuberculosis* konnte ein GC-Gehalt des Phagen von 63,6 % und des Wirtes von 65,6 % bestimmt werden. Somit konnten vergleichbare GC-Gehalte zwischen Wirt und Phage beobachtet werden. Aufgrund der hohen Wirtsspezifität und der damit eng

verbundenen evolutionären Geschichte wären vergleichbare GC-Gehalte zu erwarten. Trotzdem konnten bereits bei weiteren *P. aeruginosa*-Phagen geringe GC-Gehalte beobachtet werden. Mögliche Ursachen könnten sein, dass horizontaler Gentransfer häufig zwischen anderen Wirten und Phagen auftritt, die einen geringen GC-Gehalt haben. Des Weiteren könnte es eine charakteristische Eigenschaft dieser Phagen sein, die evolutionär bedingt auftritt (Kwan *et al.*, 2006). Das Genom des Phagen JG054 umfasst 57.839 bp und weist einen GC-Gehalt von 57,6 % auf. Damit ist die Größe dieser beiden Phagengenome vergleichbar, was auf eine Ähnlichkeit der beiden Phagen hindeutet. Durch die Verwendung der Software BLASTN konnte diese hohe Ähnlichkeit der beiden Phagengenome untereinander bestätigt werden. In der NCBI Datenbank konnte zudem eine hohe Sequenzübereinstimmung der beiden Phagen zu dem bereits publizierten *Pseudomonas* Phagen PaMx25 gefunden werden (Kap. 2.5.1). Wie auch die Phagen JG012 und JG054 wurde PaMx25 der Familie *Siphoviridae* zugeordnet. Zudem wurde ein lineares Genom mit dsDNA und einer Länge von 57.788 bp identifiziert (Sepúlveda-Robles *et al.*, 2012). Die Ergebnisse der identifizierten Homologien sind in der Tabelle 25 dargestellt.

Tabelle 25: Sequenzhomologien der Phagen JG012 und JG054 untereinander und zu bereits publizierten Phagen. Unter Verwendung der BLASTN-Software und der NCBI-Datenbank wurden Sequenzhomologien zu bereits publizierten Phagen auf DNA-Ebene gesucht. Aufgelistet sind die Phagen mit einem Ähnlichkeitsscore ≥ 90 %.

Phagen	Sequenzidentität auf DNA-Ebene	E-value	Ähnlichkeitsscore
JG012 und PaMx25	92 %	0,0	93 %
JG054 und PaMx25	86 %	0,0	91 %
JG012 und JG054	86 %	0,0	95 %

Die Identität gibt die prozentuale Ähnlichkeit zwischen der zu untersuchenden Sequenz und der Sequenz aus der Datenbank in Bezug auf den überlappenden Bereich (Ähnlichkeitsscore) an. Je ähnlicher die Sequenzen, desto höher ist der Ähnlichkeitsscore und die Identität der Sequenzen. Der Expect-value (E-value) beschreibt die Anzahl der Treffer, die erwartet werden können bei der Suche nach Sequenzen einer bestimmten Größe. Das bedeutet je größer der

Ähnlichkeitsscore (überlappende Sequenzen) desto geringer der E-value. Je geringer der E-value bzw. je näher am Wert Null, desto aussagekräftiger ist die gefundene Sequenz der Datenbank (Altschul *et al.*, 1990). Für die Phagen JG012 und JG054 untereinander als auch zu dem *Pseudomonas* Phagen PaMx25 konnten große Bereiche an überlappenden Sequenzen identifiziert werden (91 – 95 %). Zudem zeigten diese Sequenzen hohe Ähnlichkeiten (86 – 92 %). Somit konnte gezeigt werden, dass die Phagen hohe Ähnlichkeiten zueinander aufweisen, aber nicht identisch sind. Weiterhin wurde zur Veranschaulichung dieser Ähnlichkeiten ein Genomvergleich der Phagen mit progressiveMauve durchgeführt (Darling *et al.*, 2010) (Abbildung 9). Dabei repräsentieren Boxen gleicher Farbe sogenannte LCB (*local collinear blocks*), die homologe DNA-Regionen kennzeichnen. Weiße Regionen innerhalb der LCBs repräsentieren nicht-identische Sequenzen. Wie aus der Abbildung 9 deutlich wird, bilden die gesamten Genome zwei LCBs mit nur wenigen Bereichen nicht-identischer Sequenzen aus. Das deutet auf eine hohe Ähnlichkeit der Genome hin.

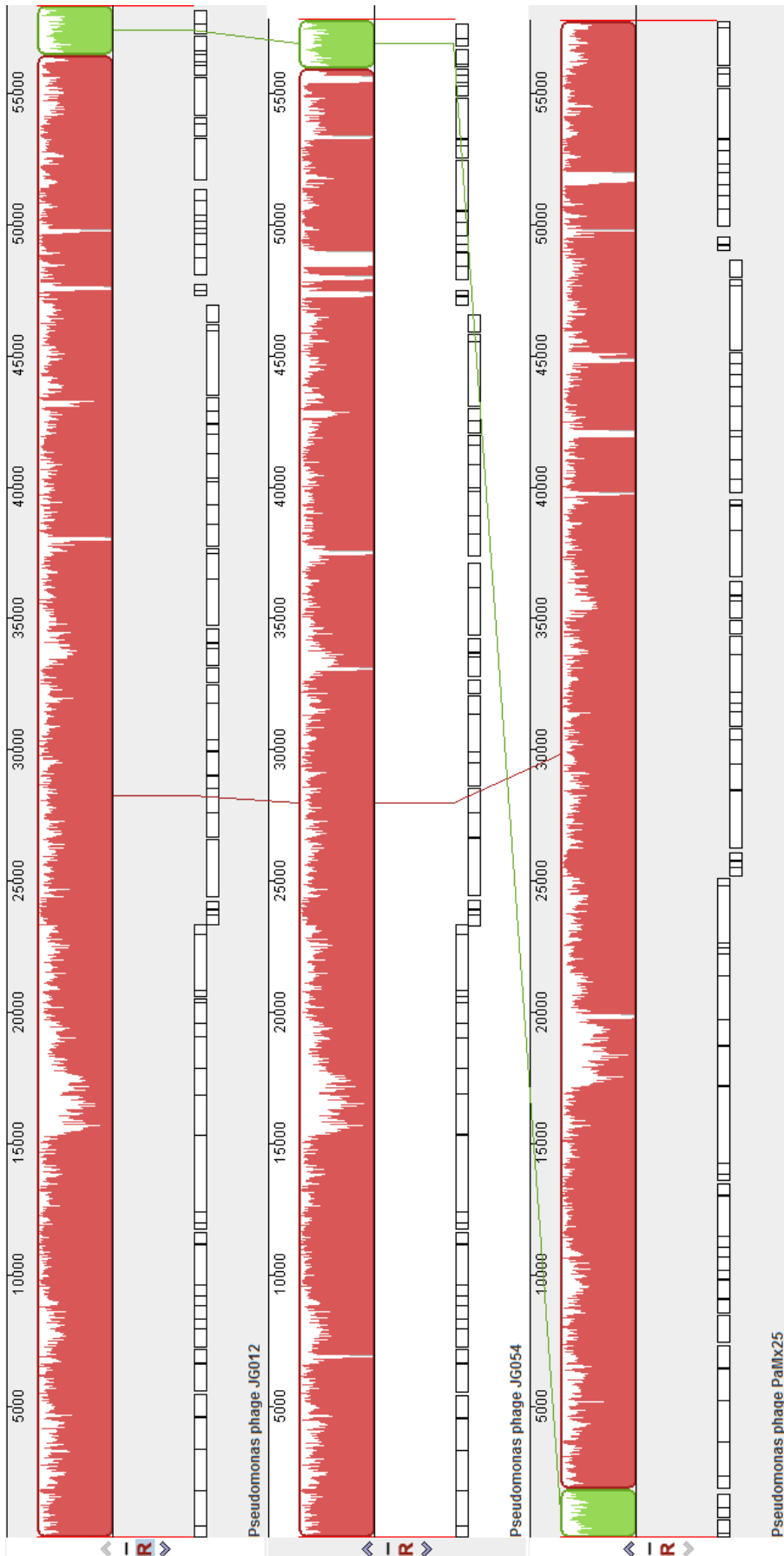


Abbildung 9: Genomvergleich der Phagen JG012, JG054 und PaMx25 mit progressiveMauve (Darling *et al.*, 2010).

Die Boxen mit identischen Farben repräsentieren LCBs (*local collinear blocks*), d.h. Regionen homologer DNA. Weiße Regionen innerhalb der LCBs repräsentieren nicht-identische Sequenzen. Für alle drei Phagen Genome konnten zwei LCBs detektiert werden, die die gesamte Sequenz einnehmen. Zudem konnten nur geringe weiße Regionen innerhalb der LCBs beobachtet werden. Somit weisen die Genome eine hohe Ähnlichkeit untereinander auf.

Die Genome wurden mit Hilfe der Prokka 1.8-Software (Dr. Boyke Bunk, DSMZ) sowie BLASTP annotiert (Kap. 2.5.1). Eine schematische Übersicht der Genome von JG012 und JG054 mit den vorhergesagten kodierenden Sequenzen (CDS, *coding sequences*) und einigen funktionellen Aufgaben sind in der Abbildung 10 und Abbildung 11 dargestellt. Alle annotierten Gene mit ihren vorhergesagten Funktionen sind in der Tabelle 33 und Tabelle 34 im Anhang aufgeführt.

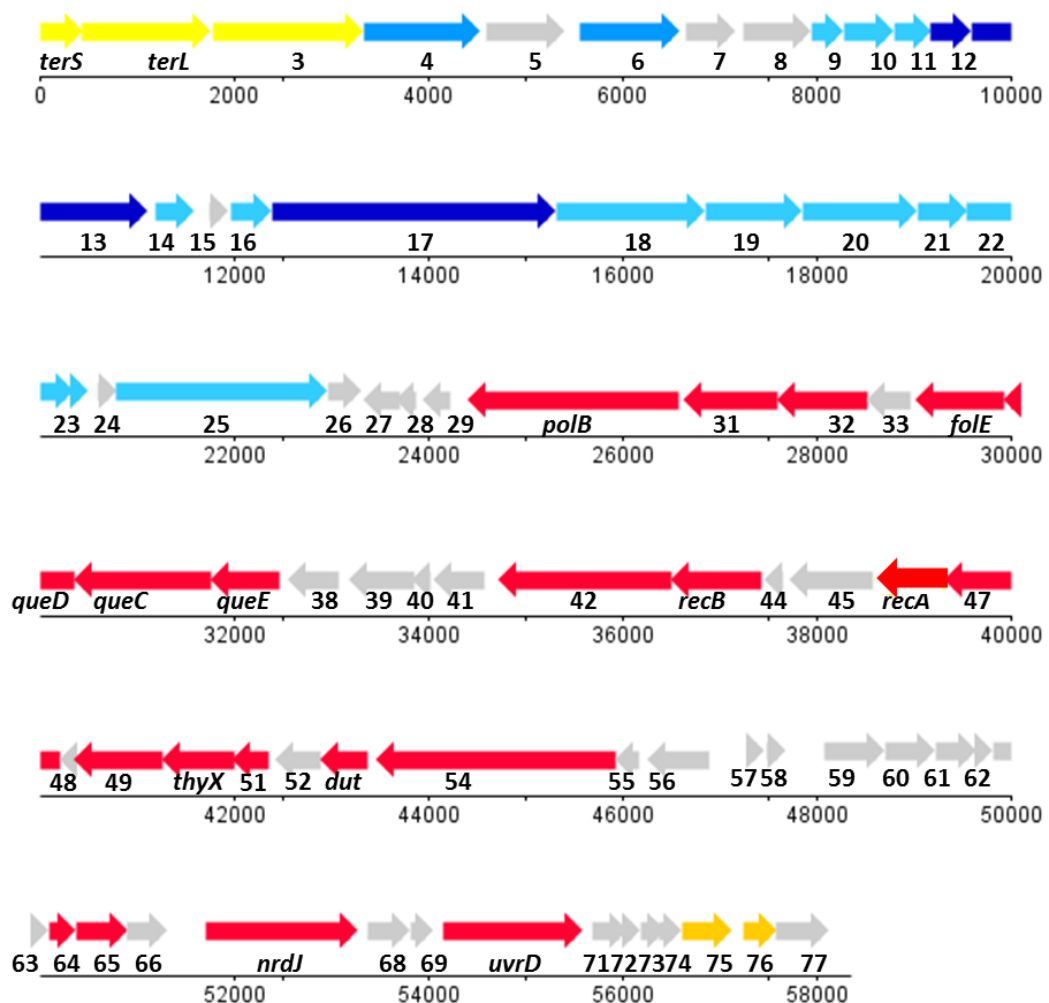


Abbildung 10: Schematische Übersicht des Phagengenoms von JG012.

Für den Phagen JG012 wurden 77 CDS detektiert, wovon 42 CDS eine putative Funktion zugeordnet werden konnte. Die CDS wurden wie folgt eingruppiert: **Gelb**: DNA Verpackung; **Blau**: Kopf-Morphogenese; **Dunkelblau**: Schwanz-Morphogenese; **Hellblau**: Strukturproteine mit unbekannter Funktion; **Rot**: DNA Replikationsapparat; **Orange**: Zelllyse; **Grau**: unbekannte Funktion. Die Pfeilspitze zeigt in Richtung der Transkription. Darstellung unter Verwendung von DNAPlotter (Carver *et al.*, 2009).

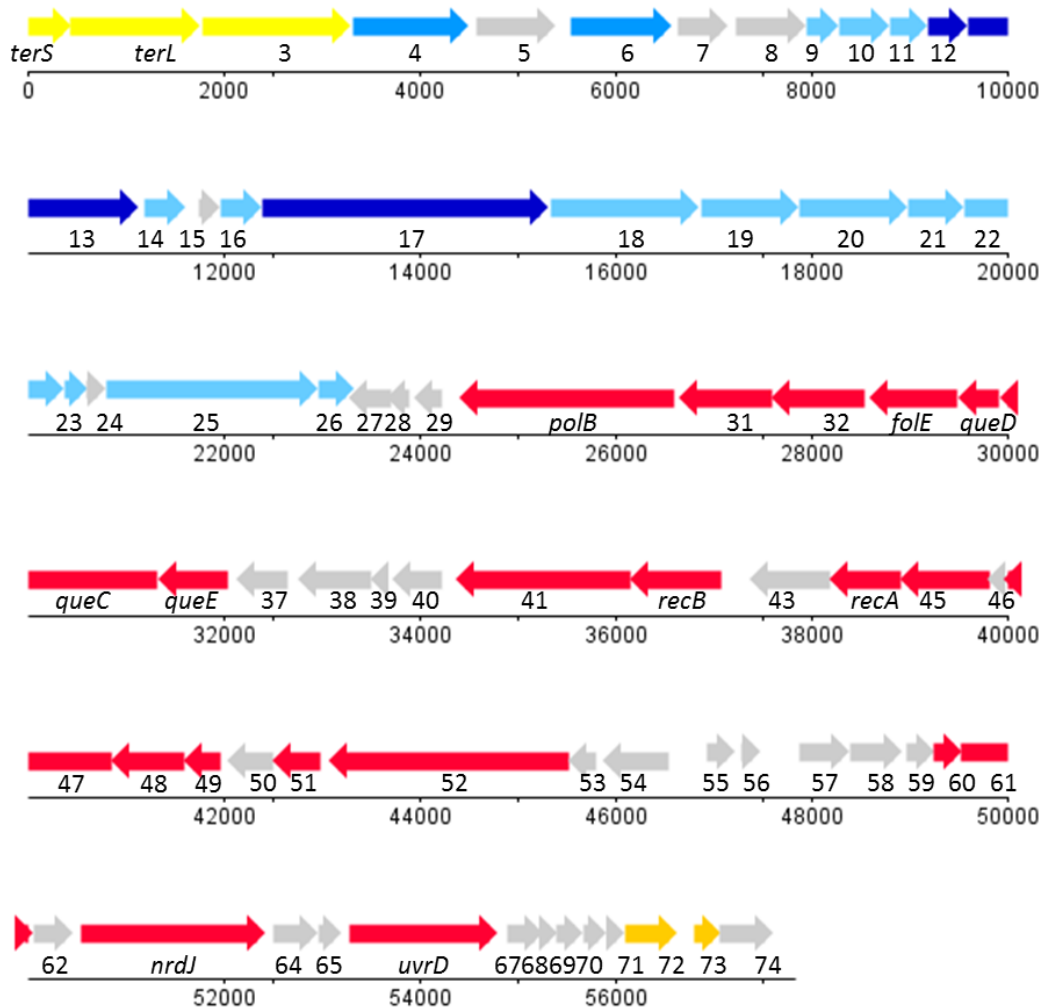


Abbildung 11: Schematische Übersicht des Phagen-genoms von JG054.

Für den Phagen JG054 wurden 74 CDS detektiert, wovon 43 CDS eine putative Funktion zugeordnet werden konnte. Die CDS wurden wie folgt eingruppiert: **Gelb:** DNA Verpackung; **Blau:** Kopf-Morphogenese; **Dunkelblau:** Schwanz-Morphogenese; **Hellblau:** Strukturproteine mit unbekannter Funktion; **Rot:** DNA Replikationsapparat; **Orange:** Zelllyse; **Grau:** unbekannte Funktion. Die Pfeilspitze zeigt in Richtung der Transkription. Darstellung unter Verwendung von DNAPlotter (Carver *et al.*, 2009).

Das Genom der beiden Phagen ist kompakt organisiert und weist einen kodierenden Bereich von 94,3 % (JG012) bzw. 94,2 % (JG054) auf. Für JG012 wurden 77 CDS prognostiziert, wovon 42 eine putative Funktion haben. Für JG054 konnten insgesamt 74 CDS vorhergesagt werden, wovon 43 CDS eine putative Funktion zugeordnet werden konnte. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der Phagen JG012 und JG054 erfolgt die Auswertung der annotierten Gene zusammen. Eine Übersicht der CDS mit putativer Funktion und der jeweiligen Lokalisierung im Genom ist in der Tabelle 26 dargestellt. Proteinhomologien

wurden auf Basis signifikanter BLASTP Übereinstimmungen identifiziert (Ähnlichkeitsscore ≥ 64 %, E-value $\leq 10^{-15}$ und Identität ≥ 41 %) (Kap. 2.5.1).

Tabelle 26: Übersicht der CDS mit putativer Funktion der Phagen JG012 und JG054.

Putative Funktion der CDS	JG012	JG054
DNA Replikationsapparat		
Superfamilie II DNA Helikase	Gen 42	Gen 41
UvrD Helikase (Superfamilie I DNA Helikase)	Gen 70 (<i>uvrD</i>)	Gen 66 (<i>uvrD</i>)
Replikative Primase	Gen 54	Gen 52
DNA Topoisomerase	Gen 47	Gen 45
Putative Nukleosidtriphosphat Hydrolase	Gen 65	Gen 61
DNA Polymerase III β Untereinheit	Gen 31	Gen 31
DNA Polymerase β	Gen 30 (<i>polB</i>)	Gen 30 (<i>polB</i>)
DNA Ligase	Gen 49	Gen 47
Exonuklease RecB	Gen 43 (<i>recB</i>)	Gen 42 (<i>recB</i>)
RNase H	Gen 51 (<i>rnaseH</i>)	Gen 49 (<i>rnaseH</i>)
Adenosylcobalamin-abhängige Ribonukleosidtriphosphat Reduktase	Gen 67 (<i>nrdJ</i>)	Gen 63 (<i>nrdJ</i>)
dUTPase	Gen 53 (<i>dut</i>)	Gen 51 (<i>dut</i>)
Thymidylatsynthase	Gen 50 (<i>thyX</i>)	Gen 48 (<i>thyX</i>)
RecA ATPase	Gen 46 (<i>recA</i>)	Gen 44 (<i>recA</i>)
Queuosin Biosynthese Gencluster (unvollständig)		
Queuosin tRNA-Ribosyltransferase	Gen 32	Gen 32
GTP Cyclohydrolase	Gen 34 (<i>folE</i>)	Gen 33 (<i>folE</i>)
Queuosin Biosyntheseprotein QueD	Gen 35 (<i>queD</i>)	Gen 34 (<i>queD</i>)
Queuosin Biosyntheseprotein QueC	Gen 36 (<i>queC</i>)	Gen 35 (<i>queC</i>)
Queuosin Biosyntheseprotein QueE	Gen 37 (<i>queE</i>)	Gen 36 (<i>queE</i>)
Morphogenese		
Putatives Schwanzterminatorprotein	Gen 12	Gen 12
Putatives Hauptstrukturprotein vom Schwanz	Gen 13	Gen 13
Putatives <i>tape measure domain</i> Protein	Gen 17	Gen 17
Putatives Kopf-Morphogeneseprotein	Gen 4	Gen 4
Putatives Hauptkopfprotein	Gen 6	Gen 6
Putative Strukturproteine	Gen 9-11, 14, 16, 18-23, 25	Gen 9-11, 14, 16, 18-23, 25-26
DNA Verpackung		
Kleine Terminase Untereinheit	Gen 1 (<i>terS</i>)	Gen 1 (<i>terS</i>)
Große Terminase Untereinheit	Gen 2 (<i>terL</i>)	Gen 2 (<i>terL</i>)
Putatives Portalprotein	Gen 3	Gen 3
Zelllyse		
Superfamilie III Holin	Gen 76	Gen 73
Putative lytische Transglykosylase	Gen 75	Gen 72

Die Mehrheit der identifizierten CDS konnten der DNA Replikation, Modifikation und Phagen Morphogenese zugeordnet werden. Dabei konnte eine komplette DNA-Replikations-Maschinerie detektiert werden, was darauf hinweist, dass die Replikation der DNA unabhängig vom Wirt durchgeführt wird. Es wurden CDS

gefunden mit Ähnlichkeiten zu Helikasen, einer Primase, DNA Topoisomerase, putative Nukleosidtriphosphat Hydrolase, DNA Polymerase III β -Untereinheit, DNA Polymerase B, DNA Ligase, Exonuklease RecB und RNase H. Weiterhin wurde eine Adenosylcobalamin-abhängige Ribonukleosidtriphosphat Reduktase (rtpR) detektiert. Diese katalysiert die Umwandlung von Ribonukleosidtriphosphat zu Desoxynukleosidtriphosphat und ist somit wesentlich an der DNA-Replikation und Reparatur beteiligt (Stubbe, 1993; Sintchak *et al.*, 2002). Ebenfalls an der DNA-Reparatur beteiligt ist die RecA ATPase. Das RecA Protein katalysiert einen ATP-abhängigen Austausch von DNA-Strängen. Dies ist ein zentraler Schritt bei der Reparatur von dsDNA-Strangbrüchen durch homologe Rekombination (Bell, 2005). Außerdem konnte eine Ähnlichkeit zur Desoxyuridin 5'-Triphosphat Nukleotidohydrolase (dUTPase) identifiziert werden. Viele Viren kodieren dieses Enzym, das die Hydrolyse von Desoxyuridintriphosphat zu Desoxyuridinmonophosphat und Pyrophosphat katalysiert. Dadurch wird die Base Uracil nicht in die DNA eingebaut. Dieser Mechanismus bewirkt zum einen den Schutz der DNA vor Mutationen und zum anderen vermittelt es einen Schutz gegen den Abbau des Phagengenoms durch die Uracil-DNA Glycosylase des Wirtes. Dieses hoch konservierte ubiquitäre Enzym katalysiert die Degradierung Uracil-haltiger DNA (Warner *et al.*, 1979; Venkatesh *et al.*, 2003; Penadés *et al.*, 2013). An der Unterbindung des Einbaus von zu großen Mengen an Uracil in das Genom ist zusätzlich die Thymidylatsynthase beteiligt. Dieses Enzym methyliert Uracil in der Form von Uridinmonophosphat, so dass es zu keinem Einbau in die DNA kommen kann (Warner *et al.*, 1979). Weiterhin konnte ein unvollständiges Queuosin-Biosynthese Gen-Cluster identifiziert werden (Queuosin tRNA-Ribosyltransferase; GTP Cyclohydrolase; Queuosin Biosyntheseprotein QueC, QueD und QueE). Viele Phagen-Gene kodieren für Proteine, die in der Biosynthese von Queuosin involviert sind. Jedoch ist die genaue Funktion bzw. der Nutzen daraus noch unbekannt. Queuosin ist ein modifiziertes Nukleosidderivat von Guanotin, das die Wobble-Position (Position 34) von tRNAs (spezifisch für Asparagin, Asparaginsäure, Histidin oder Tyrosin) besetzt. Diese Modifizierung der tRNAs beeinflusst die Spezifität der Transkription und der Codon-Erkennung, aber könnte auch in die Regulation

von zellulären Prozessen eingreifen. Somit könnte die Synthese von Queuosin die Translation des Phagengenoms optimieren oder den Wirt negativ bzw. zum Vorteil des Phagen beeinflussen. Jedoch sind die genauen Vorteile noch unbekannt (Sabri *et al.*, 2011; Kulikov *et al.*, 2014). Im Genom der Phagen JG012 und JG054 konnten keine tRNA-Gene detektiert werden (Kap. 2.5.1), was darauf hindeutet, dass das vom Phagen gebildete Queuosin tRNAs von *P. aeruginosa* modifiziert.

Weiterhin konnten 17 CDS (JG012) bzw. 18 CDS (JG054) identifiziert werden, die wahrscheinlich in der Virus-Morphogenese involviert sind. Unter einer Vielzahl an strukturellen Proteinen konnte ein putatives Schwanzterminator Protein, putatives Hauptstrukturprotein vom Schwanz, putatives *tape measure domain* Protein, putatives Kopf-Morphogeneseprotein sowie ein putatives Hauptkopfprotein identifiziert werden. Der Phagenschwanz besteht aus einem Schaft, der bei nicht-kontraktilen Phagen-Schwänzen vor allem aus mehreren Kopien des Schwanz-Hauptstrukturproteins besteht (Pell, Kanelis, *et al.*, 2009). Die korrekte Polymerisierung der Schwanz-Hauptstrukturproteine wird durch das Schwanzterminatorprotein reguliert (Pell, Liu, *et al.*, 2009). Die Schwanzlänge ist dabei proportional zur Länge des *tape measure* Proteins, was Katsura und Hendrix (1984) am Phagen λ beobachten konnten.

Für die Verpackung der DNA konnten 3 CDS identifiziert werden: die kleine Terminase-Untereinheit, die große Terminase-Untereinheit und ein putatives Portalprotein. Dabei transportiert die Terminase DNA in leere virale Prokapside. Die kleine Terminase-Untereinheit erfasst den Fortschritt der DNA-Reifung und reguliert die Verpackung der DNA durch die große Terminase-Untereinheit (Catalano, 2000; Black, 2015). Portalproteine sind in der Lage Tunnel zu bilden, die für die Translokation der DNA in die leeren viralen Kapside verantwortlich ist (Dube *et al.*, 1993; Lebedev *et al.*, 2007).

Tabelle 27: Sequenzen der Phagen JG012 und JG054, die keine Ähnlichkeiten zu dem jeweiligen anderen Phagen haben. Aufgelistet sind die Sequenzen, die keine Homologien zum jeweiligen anderen Phagen zeigen. Zudem sind die entsprechende Sequenzlänge, die CDS in dem die Sequenz liegt und das dazugehörige Produkt (Gen) mit angegeben. ¹Nukleotidposition im Genom des jeweiligen Phagen bzw. der CDS des entsprechenden Phagen.

JG012 ¹	JG054 ¹	Sequenzlänge [bp]	CDS ¹	Produkt
6886-6952	0	66	6662-7171	Hypothetisches Protein (7)
28537-28976	0	439	28531-28974	Hypothetisches Protein (33)
33448-33514	0	66	33186-33857	Hypothetisches Protein (39)
37765-37843	0	78	37725-38588	Hypothetisches Protein (45)
37957-37977	0	20		
47331-47452	0	121	47305-47469	Hypothetisches Protein (57)
48089-48874	0	785	48075-48707; 48710-49228	Hypothetisches Protein (59, 60)
49234-49492	0	258	49228-49656	Hypothetisches Protein (61)
49697-49786	0	89	49653-49829	Hypothetisches Protein (62)
54126-54150	0	24		Nicht-kodierender Bereich
0	6871-6938	67	6645-7157	Hypothetisches Protein (7)
0	33021-33154	133	32763-33503	Hypothetisches Protein (38)
0	37419-37453	34	37380-38195	Hypothetisches Protein (43)
0	46969-47253	284	46938-47240	Hypothetisches Protein (55)
0	47894-48042	148	47881-48396	Hypothetisches Protein (57)
0	48401-48687	286	48396-48932	Hypothetisches Protein (58)
0	48892-48938	46		
0	53269-53367	98	53291-54814	Putative Helikase (66)
0	55407-55666	259	55407-55670	Hypothetisches Protein (69)

Zur Lyse der Wirtszelle verwendet die Mehrheit der Phagen mit Schwanz zwei Proteine: Endolysin und Holin. Holine werden vom Phagen kodiert und in die Cytoplasmamembran des Wirtes eingebaut. Innerhalb eines genetisch programmierten Zeitfensters und einem spezifischen Signal, werden Löcher ausgebildet, die die Endolysine passieren und die Lyse der Wirtszelle bedingen (Loessner, 2005; Summer *et al.*, 2006). Im Genom der Phagen JG012 und JG054 konnte ein Gen identifiziert werden, das für ein Holin der Superfamilie III kodiert. Ähnlichkeiten zum Protein Endolysin konnten nicht gefunden werden. Allerdings konnte eine putative lytische Transglykosylase identifiziert werden, die den Aufschluss des bakteriellen Peptidoglykans katalysiert. Somit könnte dieses Protein in der Zelllyse als auch im Infektionsprozess der Phagen involviert sein (Newcombe *et al.*, 1998).

Unterschiede bzw. Sequenzen der Phagen JG012 und JG054, die keine Homologien zu dem jeweiligen anderen Phagen zeigen, konnten nur wenige detektiert werden. Dabei handelt es sich um sehr kurze Sequenzen mit Längen von 24 bp – 785 bp. Eine Auflistung der Sequenzen ist in der Tabelle 27 aufgeführt. Dabei zeigt sich, dass die meisten Sequenzabschnitte in Genen liegen, dessen Funktion noch unbekannt ist oder in nicht-kodierenden Bereichen liegen. Lediglich ein sehr kurzer (98 bp), mit dem Phagen JG012 nicht-homologer Sequenzabschnitt konnte im Anfangsbereich der Helikase (Gen 66) des Phagen JG054 gefunden werden. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der Helikase von JG054 (Gen 66) und JG012 (Gen 70) mittels BLASTP zeigte eine Homologie von 79 % (E-value 0,0; Ähnlichkeitsscore 99 %). Somit konnten keine Auffälligkeiten der jeweiligen Phagen detektiert werden, die einen Vorteil eines Phagen gegenüber den anderen z. B. während der Infektion des Wirtes oder Replikation des Phagengenoms zeigen könnten. Trotz der hohen Ähnlichkeit der beiden Phagengenome konnten Unterschiede bei der Charakterisierung der Phagen-Biologie aufgezeigt werden (Kap. 3.1.1 - 3.1.6). Beide Phagen sind charakteristisch nah verwandt, aber nicht identisch.

Tabelle 28: Nicht-identische Sequenzen des Phagen JG012 zum Phagen PaMx25. Aufgelistet sind die Sequenzen des Phagen JG012, die keine Homologien zum Phagen PaMx25 zeigen. Zudem sind die entsprechende Sequenzlänge, die CDS in dem die Sequenz liegt und das dazugehörige Produkt (Gen) mit angegeben. ¹Nukleotidposition im Genom des Phagen JG012 bzw. der entsprechenden CDS.

Nicht-identische JG012-Sequenzen zu PaMx25 ¹	Sequenzlänge [bp]	CDS ¹	Produkt (Gen)
17485 - 17510	25	16862 - 17863	Putatives Strukturprotein (19)
37799-37818	19	37725 – 38588	Hypothetisches Protein (45)
37894-38080	186		
40209-40351	142	40206 – 40361	Hypothetisches Protein (48)
42939-42994	55	42905 – 43387	dUTPase (53)
43302-43399	97		
47498-47656	158	47492 – 47695	Hypothetisches Protein (58)
47849-47932	83	-	Nicht-kodierender Bereich
49760-50099	339	49653 – 49829; 49826 - 50107	Hypothetisches Protein (62, 63)
55594-56193	599	55693 – 56058; 56036 – 56197	Hypothetisches Protein (71, 72)

Wie bereits am Anfang des Kapitels erwähnt zeigten die Phagen JG012 und JG054 hohe Sequenzübereinstimmungen mit dem *Pseudomonas* Phagen PaMx25 (94 % Sequenzidentität von JG012 mit PaMx25, 86 % Sequenzidentität von JG054 mit PaMx25). Nur wenige nicht-identische Sequenzen konnten gefunden werden, siehe Abbildung 9 weiße Regionen. Eine Übersicht der Sequenzen von JG012 und JG054, die keine Ähnlichkeiten zu Sequenzen vom *Pseudomonas* Phagen PaMx25 zeigen, sind in der Tabelle 28 und

Tabelle 29 dargestellt. Dabei fällt zum einen auf, dass es sich um sehr kurze Sequenzen mit einer Länge von 25-599 bp bei JG012 bzw. von 47-874 bp bei JG054 handelt. Zum anderen liegen die meisten Sequenzen in nicht-kodierenden Bereichen oder in Genen noch unbekannter Funktion. Eine Besonderheit der beiden Phagen könnte die dUTPase sein, die keine Übereinstimmung mit dem Phagen PaMx25 zeigte. Dadurch könnten die Phagen einen Vorteil im Infektionsprozess haben. Aufgrund des verminderten

Einbaus von Uracil in die DNA durch die dUTPase, kann die im Wirt häufig vorkommende Uracil-DNA Glycosylase die Phagen-DNA nicht erkennen und nicht degradieren. Zudem kommt es aufgrund des verminderten Uracil-Einbaus zu weniger Mutationen im Phagengenom, was das Überleben von Phagen steigern könnte (Warner *et al.*, 1979; Venkatesh *et al.*, 2003; Penadés *et al.*, 2013).

Tabelle 29: Sequenzen des Phagen JG054, die keine Ähnlichkeiten zum Phagen PaMx25 zeigen. Aufgelistet sind die Sequenzen des Phagen JG054, die keine Homologien zum Phagen PaMx25 zeigen. Zudem sind die entsprechende Sequenzlänge, die CDS in dem die Sequenz liegt und das dazugehörige Produkt (Gen) mit angegeben. ¹Nukleotidposition im Genom des Phagen JG054 bzw. der entsprechenden CDS.

JG054 Sequenzen nicht-identisch zu PaMx25 ¹	Sequenzlänge [bp]	CDS ¹	Produkt (Gen)
15577-15715	138	15336-16865	Strukturprotein (18)
33022-33124	102	32763-33503	Hypothetisches Protein (38)
37420-37672	252	37380-38195	Hypothetisches Protein (43)
39815-39934	119	39812-39967	Hypothetisches Protein (46)
42548-42947	399	42514-42993	dUTPase (51)
47245-47477	232	47296-47499	Hypothetisches Protein (56)
47653-47736	83	-	Nicht-kodierender Bereich
47893-48042	149	-	Nicht-kodierender Bereich
48402-49253	851	48396-48932; 48980-49261	Hypothetisches Protein (58, 59)
53270-53367	97	53291-54814	Putative Helikase (66)
54791-55665	874	53291-54814; 54906-55271; 55249-55410; 55407-55670	Putative Helikase (66); hypothetisches Protein (67, 68, 69)
55970-56017	47	55988-56098	Hypothetisches Protein (71)

3.1.9.2 *P. aeruginosa* Phage JG057

Das Genom des Phagen JG057 umfasst eine Größe von 44.814 bp mit einem GC-Gehalt von 57,6 %. Es ist kompakt organisiert und weist einen kodierenden Bereich von 94,6 % auf. Weiterhin konnten 72 CDS vorhergesagt werden,

wovon 16 CDS eine putative Funktion zugeordnet werden konnte. Eine schematische Übersicht des Genoms von JG057 mit den vorhergesagten CDS und funktionellen Aufgaben ist in der Abbildung 12 dargestellt. Die annotierten Gene und ihre vorhergesagten Funktionen sind in der Tabelle 51 im Anhang aufgeführt. Proteinhomologien wurden auf Basis signifikanter BLASTP Übereinstimmungen identifiziert (Ähnlichkeitsscore $\geq 46\%$, E-value $\leq 10^{-5}$, Identität $\geq 26\%$) (Kap. 2.5.1). Viele Phagengenome sind in Bezug auf Funktion oder Struktur in sogenannten Clustern aufgebaut (Moodley *et al.*, 2012; Latino *et al.*, 2014). Im Genom des Phagen JG057 konnte ein Cluster identifiziert werden, in dem vorrangig Gene liegen, die für Strukturproteine kodieren. Ebenso konnte ein Cluster mit Genen lokalisiert werden, die an der DNA-Replikation beteiligt sind. Angeschlossen daran Gene, die an der Lyse der Wirtszelle beteiligt sind. Diese Clusterbildung verdeutlicht eine Strukturierung des Genoms in Funktionsbereiche. Nach der Injektion des Phagen-Genoms beginnt eine Umprogrammierung des Wirtsmetabolismus, so dass das Phagen-Genom repliziert und neue Phagenpartikel produziert werden. Am Ende erfolgt die Lyse der Wirtszelle (Weinbauer, 2004). Diese Strukturierung könnte eine effiziente Translation und Transkription ermöglichen, so dass in kürzester Zeit neue Phagen gebildet werden können. Zudem ermöglicht diese Clusterbildung eine unabhängige Translation der einzelnen Funktionsbereiche, so dass beispielsweise die Gene, die an der Lyse der Wirtszelle beteiligt sind erst gegen Ende des Infektionsverlaufs translatiert und transkribiert werden. Im Genom von JG057 konnte die große Terminase-Untereinheit (Gen 49) identifiziert werden, die an der Verpackung der Phagen-DNA in die Prokapside beteiligt ist (vgl. Kap. 3.1.9.1). Nachfolgend im Genom konnten einige Strukturproteine identifiziert werden, die an der Morphogenese beteiligt sind. Darunter u.a. eine Endoprotease (Gen 44), ein Hauptkapsidprotein (Gen 43), ein internes Virionprotein A und B (Gen 38, 37), Lysozym (Gen 36) und ein Schwanzfaserprotein (Gen 33). Aufgrund der Lage der Endoprotease nach der Terminase und vor einem Hauptkapsidprotein, könnte diese an der Reifung der Phagenpartikel durch die Hydrolyse des Hauptkapsidproteins beteiligt sein (Martín *et al.*, 1998). Der Phage JG057 konnte der Familie *Podoviridae* zugeordnet werden (vgl. Kap. 3.1.5). Phagen der Familie *Podoviridae* besitzen

einen sehr kurzen nicht-kontraktilen Schwanz, weshalb die Adsorption und folgende Injektion des Phagen-genoms erschwert wird. Aufgrund dessen wird durch das Zusammenspiel einiger Proteine ein Tunnel gebildet, durch den die Phagen-DNA in den Wirt injiziert werden kann. Daran könnten u.a. die im Genom identifizierten internen Virionproteine A und B beteiligt sein, wobei während der Injektion ebenso das interne Virionprotein B mit in die Wirtszelle geschleust wird (Molineux, 2001; Tidona and Darai, 2011). Ebenso daran beteiligt sein könnte das Lysozym, das ein Durchdringen der Zellmembran ermöglicht (Fastrez, 1996).

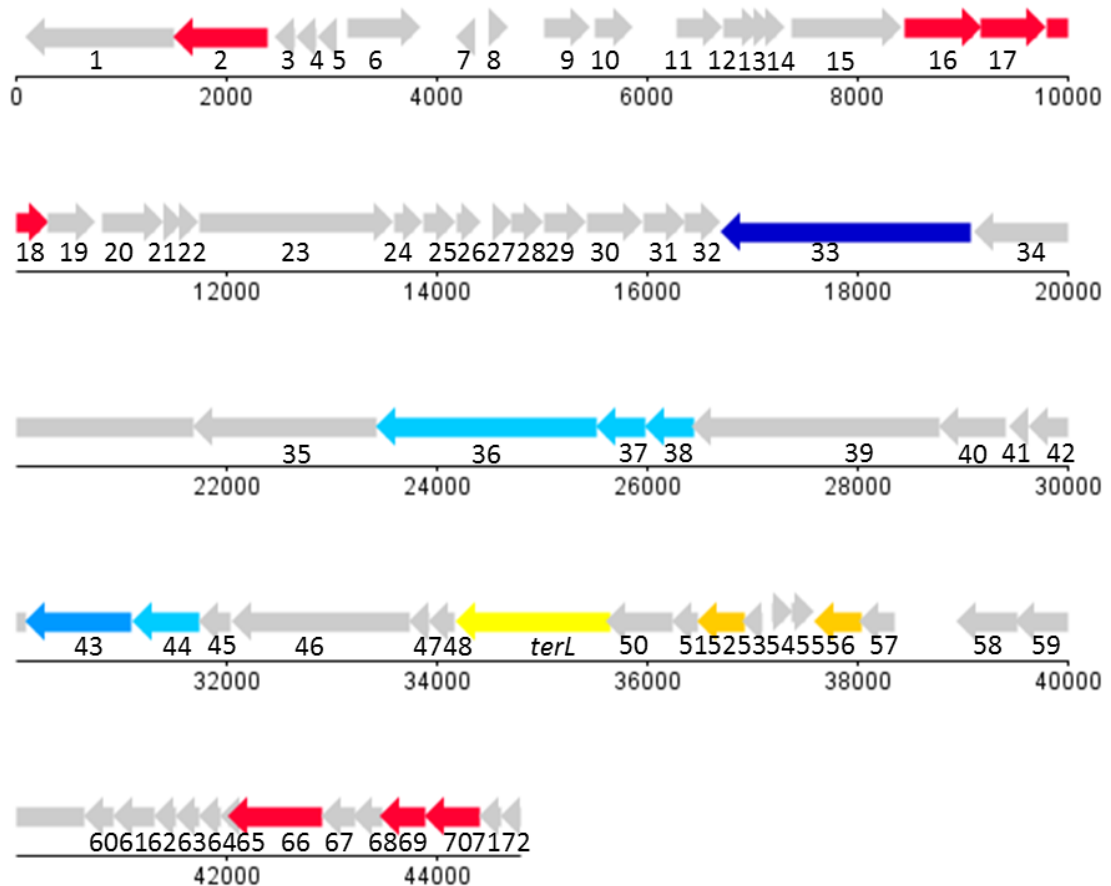


Abbildung 12: Schematische Übersicht des Phagen-genoms von JG054.

Für den Phagen JG057 wurden 72 CDS detektiert, wovon 16 CDS eine putative Funktion zugeordnet werden konnte. Die CDS wurden wie folgt eingruppiert: **Gelb**: DNA Verpackung; **Blau**: Kopf-Morphogenese; **Dunkelblau**: Schwanz-Morphogenese; **Hellblau**: Strukturproteine; **Rot**: DNA Replikationsapparat; **Orange**: Zelllyse; **Grau**: unbekannte Funktion. Die Pfeilspitze zeigt in Richtung der Transkription. Darstellung unter Verwendung von DNAPlotter (Carver *et al.*, 2009).

Die Mehrheit an CDS, die Ähnlichkeiten zu bereits charakterisierten Sequenzen zeigten, konnten der DNA Replikation und Modifikation zugeordnet werden. Es

konnten Gene identifiziert werden, die für folgende Funktionen kodieren: Homing Endonuklease (Gen 18), HNH Endonukleasen (Gen 70, 66), Exonuklease (Gen 17), Rekombinationsprotein Bet (Gen 16), Replikationsprotein O (Gen 2) und Rekombinase NinB (Gen 69). Das Replikationsprotein O ist dabei in die bidirektionale Replikation der dsDNA involviert (LeBowitz and McMacken, 1984). Die Proteine Bet und NinB sind an der Rekombination der DNA beteiligt, wodurch u.a. mutierte DNA repariert werden kann. Zudem führt die Rekombination der DNA zur genetischen Variabilität des Phagen (Murphy, 2000; Curtis *et al.*, 2011). Ebenfalls an der genetischen Rekombination beteiligt sind Homing Endonukleasen und HNH Endonukleasen, die Einzel- oder Doppelstrangbrüche der DNA verursachen und somit u.a. die Rekombination mobiler genetischer Elemente und Introns bedingen (Belfort and Roberts, 1997; Stoddard, 2005; Moodley *et al.*, 2012). Aufgrund dieser genetischen Reorganisation durch Rekombinasen und Endonukleasen, aber auch durch horizontalen Gentransfer zwischen Phagen als auch zwischen Phagen und ihrem Wirt, besitzen Phagen eine bemerkenswerte Diversität. Zudem ist dies die Ursache für die unter den Phagen weitverbreitete Mosaikstruktur des Genoms. Dabei ist das Genom in einzelne Module aufgeteilt, die verschieden kombiniert unter den Phagen auftreten können und zudem zwischen Populationen ausgetauscht werden können (Hatfull, 2008; Curtis *et al.*, 2011). Aufgrund dessen können ebenso in nah verwandten Phagen bzw. Phagen mit ähnlichen Infektionszyklen und Morphotypen, die normalerweise eine ähnliche Genstruktur und Transkriptionsmuster aufweisen, Individuen auftreten, die sich stark in ihrer Nukleotidsequenz von den anderen unterscheiden (Casjens, 2005).

Beim Abgleich des Genoms des Phagen JG057 mit der NCBI-Datenbank (mittels BLASTN) konnten Sequenzübereinstimmungen mit dem bereits publizierten *P. aeruginosa* Phagen vB_PaeP_Tr60_Ab31 (Ab31) gefunden werden (Kap. 2.5.1). Es konnte ein Ähnlichkeitsscore von 69 % und davon eine Sequenzidentität von 93 % bei einem E-value von 0,0 ermittelt werden. Zur Veranschaulichung dieser Ähnlichkeiten wurde ein Genomvergleich mit progressiveMauve (Darling *et al.*, 2010) durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Vergleiches sind in der Abbildung 13 dargestellt. Dabei können zwei LCB

beobachtet werden, die homologe DNA-Regionen anzeigen. Jedoch weisen diese LCBs eine Vielzahl an weißen Bereichen auf, die für nicht-identische Sequenzen stehen. Somit zeigt sich eine geringe Ähnlichkeit der beiden Phagen, was die Ergebnisse der BLASTN-Software bestätigen. Für den Phagen Ab31 konnte ein ikosaedrischer Kopf (60 nm) mit einem kurzen nicht-kontraktilen Schwanz beschrieben werden, woraufhin eine Zuordnung zur Familie der *Podoviridae* erfolgte. Weiterhin konnte ein zirkuläres Genom mit einer Größe von 45.550 bp und einem GC-Gehalt von 57 % identifiziert werden (Latino *et al.*, 2014). Somit zeigen die Phagen JG057 und Ab31 viele Ähnlichkeiten in Bezug auf die Morphologie sowie der Genomgröße und des GC-Gehalts. Während der Annotation zeigten von 72 vorhergesagten CDS 27 CDS Homologien zu dem Phagen Ab31, 25 CDS zu anderen Phagen und für 20 CDS konnten keine Homologien identifiziert werden. Aufgrund dessen auf genetischer Ebene nur geringe Homologien zwischen den Phagen JG057 und Ab31 beobachtet werden konnten. Folglich sind die beiden Phagen nicht identisch.

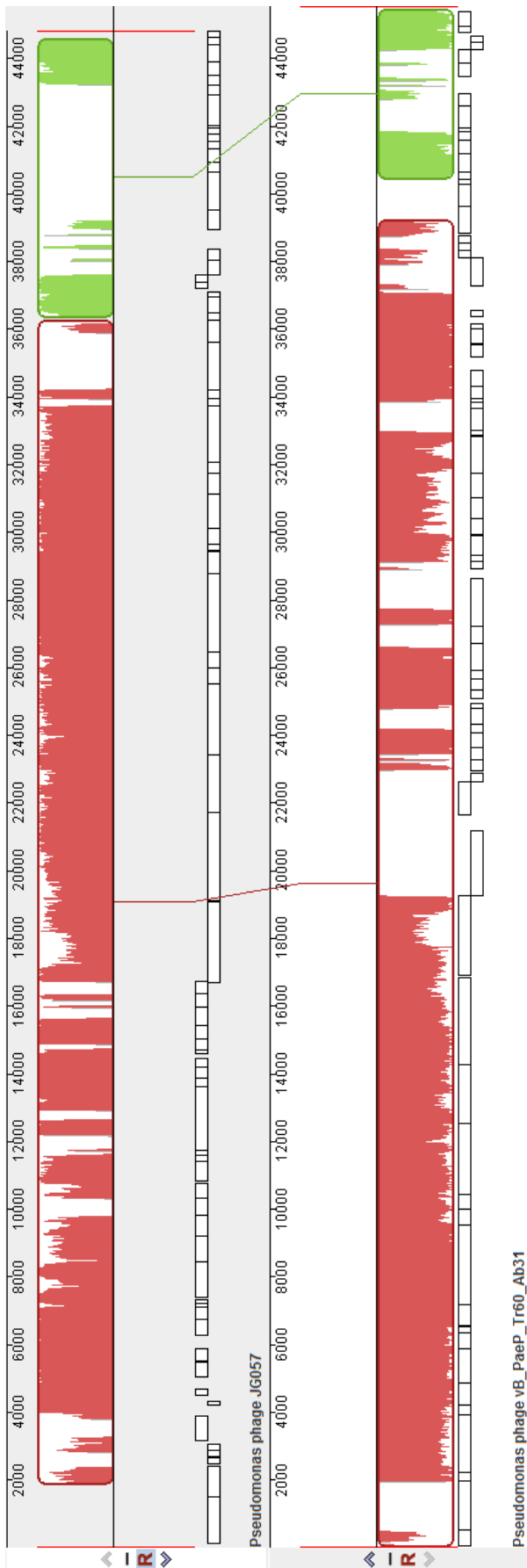


Abbildung 13: Genomvergleich der *P. aeruginosa* Phagen JG057 und vB_PaeP_Tr60_Ab31 mit progressiveMauve (Darling *et al.*, 2010). Die Boxen mit identischen Farben repräsentieren LCBs (*local collinear blocks*), d.h. Regionen homologer DNA. Weiße Regionen innerhalb der LCBs repräsentieren nicht-identische Sequenzen. Es konnten zwei LCBs detektiert werden, die den Großteil der Sequenz einnehmen. Innerhalb der LCBs konnte eine Vielzahl an weißen Regionen und somit nicht-identischer Sequenzen ausgemacht werden. Schlussfolgernd weisen die Genome eine geringe Ähnlichkeit auf.

3.1.10 Diagnostik von lebenden *P. aeruginosa* Bakterien mittels Phagen

Mittels der in den vorigen Kapiteln charakterisierten Phagen sollte ein Diagnostik-System zum Nachweis von lebenden *P. aeruginosa* Bakterien entwickelt werden. Dazu wurden die Phagen JG012, JG054 und JG024 sowie die Bakterienstämme *P. aeruginosa* PAO1 DK und *P. aeruginosa* PA14 verwendet. In einer vorhergehenden Arbeit erfolgte bereits eine detaillierte Charakterisierung des Phagen JG024 (Garbe *et al.*, 2010). Auch wegen dieser Vorkenntnisse wurde dieser Phage für die Etablierung des Diagnostik-Systems herangezogen. Der Phage JG024 kann u.a. die Stämme *P. aeruginosa* PAO1 DK und *P. aeruginosa* PA14 infizieren und erkennt diese über Lipopolysaccharidstrukturen. Der Phage JG054 erkennt und infiziert ebenfalls *P. aeruginosa* PAO1 DK und *P. aeruginosa* PA14 jedoch über Pili-Strukturen. Der Phage JG012 hingegen infiziert nur *P. aeruginosa* PA14 und erkennt diesen über Pili-Strukturen. Im Folgenden wurde die Interaktion der Phagen JG012 und JG054 mit *P. aeruginosa* PA14 und des Phagen JG024 mit *P. aeruginosa* PAO1 DK untersucht.

3.1.11 Infektiosität von auf Nanopartikeln immobilisierten Phagen

Zur besseren Unterscheidung der infizierenden von den neugebildeten Phagen im Diagnostik-System sollten die infizierenden Phagen immobilisiert werden. Zur Immobilisierung der Phagen wurden magnetische Nanopartikel mit verschiedenen Oberflächenfunktionalitäten bezüglich der Immobilisierungseffizienz verglichen: Dynabeads® M-270 Epoxy, Dynabeads® M-270 Carboxylic Acid und Roti®-MagBeads COOH HP58 (siehe Kap. 2.3.1). Für die Immobilisierung wurden mittels Filtration aufgereinigte Phagensuspensionen verwendet (siehe Kap. 2.2.8). Bei der Immobilisierung an die Dynabeads® M-270 Carboxylic Acid wurden, gemäß den Herstellerangaben, drei verschiedene Protokolle getestet. Zuerst wurde das Ein-Schritt Bindeverfahren und dann das Zwei-Schritt Bindeverfahren in zwei Variationen nämlich mit und ohne N-Hydroxysuccinimid (NHS) getestet (siehe Kap. 2.3.1.2). Das Ein-Schritt Bindeverfahren wird eigentlich empfohlen bei Liganden, die keine Carbonsäuregruppen tragen. Die Zwei-Schritt Bindeverfahren werden bevorzugt, wenn die Liganden Carbonsäuregruppen enthalten. Da der Aufbau

der Phagenhülle bezüglich der für eine Bindung zu nutzenden Gruppen nicht vorhersagbar ist, wurden alle drei Protokolle getestet. Die Aktivierung der Dynabeads® M-270 Carboxylic Acid erfolgte durch die Verwendung von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimid Hydrochlorid (EDC). Das dabei entstehende Produkt ist sehr labil und kann schnell hydrolysieren. Durch die Verwendung von NHS kann dieser Zustand stabilisiert werden. Die Ergebnisse der Immobilisierungen sind in der Tabelle 30 zusammengefasst. Zur Kontrolle einer möglichen Inhibition durch die verwendeten Immobilisierungsreagenzien (siehe Kap. 2.3.1) wurden die Phagen in Abwesenheit der Nanopartikel mit diesen Reagenzien parallel inkubiert. Zudem gibt dieser Kontrollansatz Aufschluss über die tatsächliche Anzahl der eingesetzten Phagen. Zur Bestimmung des Phagentiters nach der Inkubation sowie der Immobilisierungseffizienz wurden Plaqueassays durchgeführt (Kap. 2.2.9). Dabei entspricht ein Plaque (Plaqueassay mit den immobilisierten Nanopartikeln) einem Nanopartikel an dem mindestens ein Phage gebunden wurde. Im Ein-Schritt Bindeverfahren konnten weder immobilisierte Nanopartikel noch Phagen in der Kontrolle detektiert werden. Im Zwei-Schritt Bindeverfahren (mit und ohne NHS) zeigten die Phagen JG012 und JG024 jeweils die gleiche Anzahl an immobilisierten Nanopartikeln. Für den Phagen JG054 wurde im Vergleich zu dem Zwei-Schritt Bindeverfahren ohne NHS bei dem Zwei-Schritt Bindeverfahren mit NHS eine leicht geringere Anzahl an immobilisierten Nanopartikeln beobachtet. Für das Ein-Schritt Bindeverfahren wurde eine Inaktivierung der Phagen durch die verwendeten Reagenzien geschlussfolgert, weil im Kontrollansatz keine Phagen mehr detektiert werden konnten. Im Zwei-Schritt Bindeverfahren (mit und ohne NHS) konnten keine bis geringfügige Unterschiede bezüglich der Anzahl an immobilisierten Nanopartikeln beobachtet werden. Mögliche sterische Probleme, durch die Stabilisierung der aktivierten Carbonsäuregruppen auf den Nanopartikeln durch NHS, könnten in einer reduzierten Bindung des Phagen JG054 resultieren.

Tabelle 30: Immobilisierung der Phagen an Dynabeads mit verschiedenen Oberflächenfunktionen. Immobilisiert wurden die mittels Filtration aufgereinigten Phagen JG012, JG024 und JG054 (Kap. 2.2.8). Die Durchführung erfolgte gemäß Kap. 2.3.1, dabei wurden ca. 2×10^9 Nanopartikel eingesetzt. Die Kontrolle zeigt zum einen mögliche Inhibierungen der Phagen durch die Immobilisierungsreagenzien an. Zum anderen gibt sie Aufschluss über die Zahl der tatsächlich eingesetzten Phagen. Ein immobilisierter Nanopartikel ist als ein Nanopartikel definiert, an dem mindestens ein Phage kovalent gebunden ist.

magnetische Nanopartikel	Verfahren	Phage	theoretisch eingesetzte Phagenmenge [pfu/mL]	Kontrolle [pfu/ml]	immobilisierte Nanopartikel [pfu/ml]
Dynabeads® M-270 Carboxylic Acid	Zwei-Schritt Bindeverfahren (ohne NHS)	JG012	10^9	10^9	10^3
		JG024	10^9	10^9	10^6
		JG054	10^9	10^9	10^3
	Zwei-Schritt Bindeverfahren (mit NHS)	JG012	10^9	10^9	10^3
		JG024	10^9	10^9	10^6
		JG054	10^9	10^9	10^1
	Ein-Schritt Bindeverfahren	JG012	10^9	-	-
		JG024	10^9	-	-
		JG054	10^9	-	-
Dynabeads® M-270 Epoxy		JG012	10^9	10^9	10^5
		JG024	10^9	10^9	10^7
		JG054	10^9	10^{10}	10^7
Roti®-MagBeads COOH HP58		JG012	10^9	10^9	-
		JG024	10^9	10^9	10^6
		JG054	10^9	10^9	-

Bei dem Vergleich der verschiedenen Nanopartikel untereinander konnte für den Phagen JG024 kein Unterschied bezüglich der Anzahl an immobilisierten Nanopartikeln beobachtet werden. Die Phagen JG012 und JG054 zeigten bei den Roti®-MagBeads COOH HP58 keine Bindung. Die Immobilisierung der Phagen JG012 und JG054 an die Dynabeads® M-270 Epoxy resultierte in einer höheren Anzahl an immobilisierten Nanopartikeln im Vergleich zu den Dynabeads® M-270 Carboxylic Acid. Somit konnte für alle drei Phagen die höchste Anzahl an immobilisierten Nanopartikeln, entsprechend die beste Bindungseffizienz, mit den Dynabeads® M-270 Epoxy erzielt werden. Die beobachtete unterschiedlich starke Bindung der Phagen an die verschiedenen Oberflächenstrukturen der Nanopartikel deutet daraufhin, dass die

Zusammensetzung der Proteine der Phagenhülle verschieden ist. Die Phagenhülle ist in Kopf- und Schwanzteil gegliedert. Die Proteine die sich an den Schwanzfasern und der Basisplatte (*baseplate*) befinden sind an dem Prozess der Adsorption und der Injektion der Phagen-DNA beteiligt. Die Proteine des Phagenkopfes sind an dessen Aufbau und an der Verpackung der DNA in die Phagenköpfe involviert (Kutter *et al.*, 2005). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Dynabeads® M-270 Epoxy am besten zur Immobilisierung der Phagen JG012, JG024 und JG054 geeignet waren.

Im Anschluss wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der immobilisierten Phagen-Nanopartikel angefertigt (siehe Kap. 2.2.11). Zum einen sollte die erfolgreiche Immobilisierung mit Hilfe dieser Methode bestätigt werden und zum anderen sollten die Bilder Aufschluss über die Verteilung der Phagen auf den Nanopartikeln geben. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten eine Vielzahl an Zellfragmenten von *P. aeruginosa*, die an die gesamte Oberfläche der Nanopartikel adhärten. Dadurch war eine Beobachtung der immobilisierten Phagen nicht gegeben. Schlussfolgernd waren die verwendeten Phagensuspensionen zu stark mit Zellfragmenten von *P. aeruginosa* verunreinigt. Aufgrund dessen erfolgte die Etablierung eines Protokolls zur weiteren Aufreinigung der Phagen mittels PEG-Präzipitation und CsCl-Dichte-Gradienten-Zentrifugation (siehe Kap. 2.2.8). Anschließend elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigten die Reinheit der zusätzlich aufgereinigten Phagen sowie die erfolgreiche Bindung der Phagen an die Dynabeads. In Abbildung 14 sind exemplarisch elektronenmikroskopische Aufnahmen von mit JG012 immobilisierten Dynabeads® M-270 Epoxy dargestellt. Anhand dessen sind die Dynabeads deutlich zu erkennen. Des Weiteren kann eine gleichmäßige Verteilung der Phagen über die Oberfläche der Dynabeads beobachtet werden (Abbildung 14 Pfeil). Anhand des rechten Bildes der Abbildung 14, das ca. 1/8 eines ganzen Dynabeads entspricht, konnten ca. 70 gebundene Phagen gezählt werden. Aufgrund der gleichmäßigen Verteilung der Phagen über die Oberfläche konnten dementsprechend ca. 560 Phagen pro Dynabead immobilisiert werden.

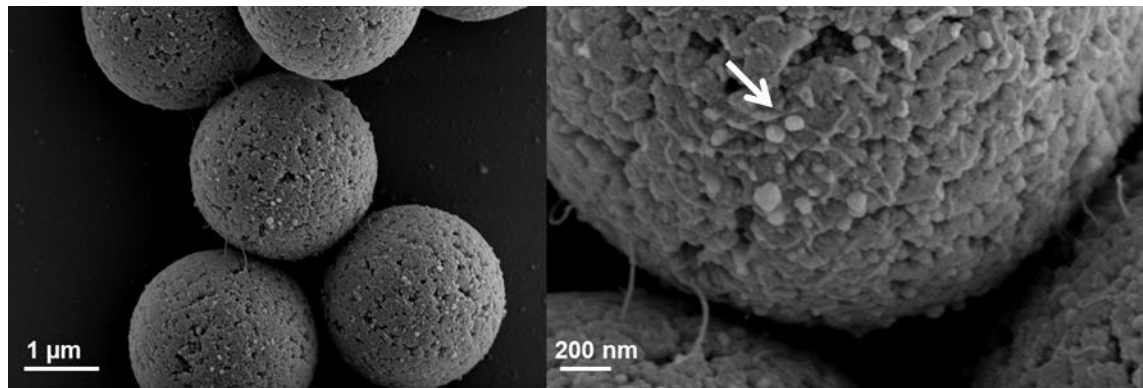


Abbildung 14: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Dynabeads® M-270 Epoxy mit immobilisierten JG012 Phagen (siehe Pfeil) (von Prof. Dr. Manfred Rohde, HZI, Braunschweig). Das linke Bild zeigt mehrere Dynabeads® M-270 Epoxy mit den gleichmäßig verteilten immobilisierten Phagen. Im rechten Bild ist eine Nahaufnahme von den immobilisierten Phagen abgebildet (siehe Pfeil).

Ebenso lässt sich die Zahl der gebundenen Phagen pro Dynabead aus den experimentellen Daten ableiten. Dazu wird die Zahl der immobilisierten Nanopartikel durch die Anzahl der tatsächlich verwendeten Phagen (Kontrolle) dividiert. Zur Immobilisierung wurden ca. 3×10^{11} pfu/mL an Phagen eingesetzt. Mittels Plaqueassay konnten ca. 5×10^8 immobilisierte Nanopartikel/mL bestimmt werden (Kap. 2.3.1). Daraus ergibt sich eine Phagenanzahl pro Nanopartikel von ca. 600, was recht genau der mittels elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestimmten Anzahl (560) entspricht. Somit kann bereits anhand der experimentellen Daten eine genaue Bestimmung der Anzahl an Phagen pro Dynabead erfolgen. Nachdem die Phagensuspensionen erfolgreich aufgereinigt und an verschiedene Typen von Dynabeads gekoppelt wurden, erfolgte die Überprüfung der Bindungseffizienz. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 31 zusammengefasst. Dabei zeigte sich eine Verbesserung der Bindungseffizienz der Phagen JG012 und JG054 an allen getesteten Nanopartikeln (im vgl. Tabelle 30). Auf den Dynabeads® M-270 Epoxy konnten die meisten Phagen immobilisiert werden. Durch die Anwendung der Methode der PEG-Präzipitation mit anschließender CsCl-Dichte-Gradienten-Zentrifugation konnte in der resultierenden Phagensuspension ein höherer Phagentiter erreicht werden. Dadurch war es möglich größere Mengen an Phagen zur Immobilisierung einzusetzen. Das wiederum resultierte in einer höheren Anzahl an immobilisierten Phagen auf den Nanopartikeln (siehe Tabelle 31). Es konnten $5 \times 10^2 - 6 \times 10^4$ Phagen/Nanopartikel immobilisiert

werden. Aufgrund dessen, dass mit den Dynabeads® M-270 Epoxy die meisten Nanopartikel immobilisiert (bis zu 1×10^9 Phagen-Nanopartikel/mL) und bis zu 1×10^3 Phagen/Nanopartikel gebunden werden konnten, wurden diese für die folgenden Immobilisierungen eingesetzt.

Tabelle 31: Immobilisierung der mittels CsCl-Dichte-Gradienten-Zentrifugation aufgereinigten Phagen an Dynabeads mit verschiedenen Oberflächenfunktionen. Die Phagen wurden mittels PEG-Präzipitation aufkonzentriert und durch CsCl-Dichte-Gradienten-Zentrifugation aufgereinigt (Kap. 2.2.8). Die Immobilisierung erfolgte gemäß Herstellerangaben, dabei wurden 2×10^9 Nanopartikel eingesetzt (Kap. 2.3.1). Die Kontrolle zeigt zum einen mögliche Inhibierungen der Phagen durch die Immobilisierungsreagenzien an. Zum anderen gibt sie Aufschluss über die Zahl der tatsächlich eingesetzten Phagen. Unter "immobilisierte Nanopartikel" ist die Zahl der Nanopartikel aufgeführt, an denen mindestens ein Phage kovalent gebunden wurde.

magnetische Nanopartikel	Phage	eingesetzte Phagenmenge [pfu/mL]	Kontrolle [pfu/ml]	immobilisierte Nanopartikel [pfu/ml]
Dynabeads® M-270 Carboxylic Acid (Zwei-Schritt Bindeverfahren (ohne NHS))	JG012	5×10^{11}	$2,6 \times 10^{11}$	$4,0 \times 10^6$
	JG024	7×10^{10}	$2,7 \times 10^{10}$	$5,5 \times 10^6$
	JG054	5×10^{11}	$7,5 \times 10^{11}$	$5,0 \times 10^6$
Dynabeads® M-270 Epoxy	JG012	5×10^{11}	$9,0 \times 10^{11}$	$6,0 \times 10^8$
	JG024	7×10^{10}	$1,1 \times 10^{11}$	$2,9 \times 10^7$
	JG054	5×10^{11}	$5,0 \times 10^{11}$	$9,5 \times 10^8$
Roti®-MagBeads COOH HP58	JG012	5×10^{11}	$2,1 \times 10^{11}$	$3,0 \times 10^4$
	JG024	7×10^{10}	$3,5 \times 10^9$	$1,8 \times 10^5$
	JG054	5×10^{11}	$2,5 \times 10^{11}$	$1,1 \times 10^7$

Im Anschluss wurden Wachstumsexperimente durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Immobilisierung der Phagen deren Infektiosität beeinflusst (siehe Kap. 2.2.14). Dazu wurden mit den Phagen JG012, JG024 und JG054 kovalent gebundene Dynabeads® M-270 Epoxy und die entsprechende Menge an freien Phagen mit *P. aeruginosa* inkubiert. Weiterhin wurden Kontrollen zur Überprüfung möglicher Ablösungen der Phagen von den Dynabeads® M-270 Epoxy durchgeführt. Dabei wurde überprüft, ob die gewählten Inkubationsbedingungen (Kontrolle 1) oder von *P. aeruginosa* produzierte extrazelluläre Stoffe (Kontrolle 2) eine Ablösung der Phagen von den Dynabeads bewirken (Kap. 2.2.14). *P. aeruginosa* produziert eine Vielzahl an extrazellulären Proteinen u.a. proteolytische Enzyme (Liu, 1974). Diese könnten eine Hydrolyse der Bindungen zwischen den magnetischen Nanopartikeln und

den Phagen bedingen. Für die Bestimmung der Phagentiter wurden die freigesetzten Phagen nicht von den eingesetzten Phagen bzw. immobilisierten Nanopartikeln getrennt. Aufgrund dessen gibt der ermittelte Titer der freien Phagen die Gesamtheit der eingesetzten sowie freigesetzten Phagen wieder. Bei den immobilisierten Phagen gibt der Titer die Gesamtheit der eingesetzten immobilisierten Nanopartikel sowie der freigesetzten Phagen wieder. Folglich zeigt ein Anstieg des Titers eine Freisetzung neugebildeter Phagen an. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 15 zusammengefasst. Bei den freien Phagen JG012 und JG054 konnte innerhalb der ersten 20 min eine Abnahme des Titers beobachtet werden (Abbildung 15 A und C Schwarz). Bei dem Phagen JG012 sank der Titer von ca. 4×10^5 pfu/mL auf ca. 2×10^5 pfu/mL und bei dem Phagen JG054 ebenfalls von ca. 4×10^5 pfu/mL auf ca. 1×10^5 pfu/mL. Die Reduktion des Phagentiters erfolgt durch die Adsorption der Phagen an *P. aeruginosa* PA14. Anschließend werden strukturelle Proteine synthetisiert, das Phagengenom repliziert und zu neuen Phagenpartikeln assembliert. Die darauffolgende bakterielle Lyse und Freisetzung der neugebildeten Phagen kann anhand eines starken Anstiegs des Phagentiters auf ca. 2×10^7 pfu/mL (JG012) bzw. 6×10^6 pfu/mL (JG054) (nach 80 min) beobachtet werden. Das Maximum (Plateau) der Freisetzung wird nach ca. 110 min mit einem Titer von ca. 3×10^7 pfu/mL (JG012) bzw. von ca. 1×10^7 (JG054) erreicht. Im Anschluss erfolgt die erneute Infektion mit abschließender Freisetzung der neugebildeten Phagen. Der Verlauf der Infektion und Reproduktion der Nanopartikel-gebundenen Phagen JG012 und JG054 verlief ähnlich zu den oben beschriebenen (Abbildung 15 A und C Grün). Allerdings wurde eine geringe Anzahl an freigesetzten Phagen nachgewiesen. Nach ca. 110 min (Plateau) konnten nur ca. 5×10^6 pfu/mL (JG012) bzw. 4×10^6 pfu/mL (JG054) detektiert werden. Für den freien Phagen JG024 konnte ebenfalls eine Reduktion des Titers innerhalb der ersten 20 min von ca. $1,4 \times 10^5$ pfu/mL auf ca. 1×10^5 pfu/mL beobachtet werden. Allerdings konnte bereits das Maximum der Freisetzung der neugebildeten Phagen nach 80 min mit ca. 6×10^6 pfu/mL detektiert werden.

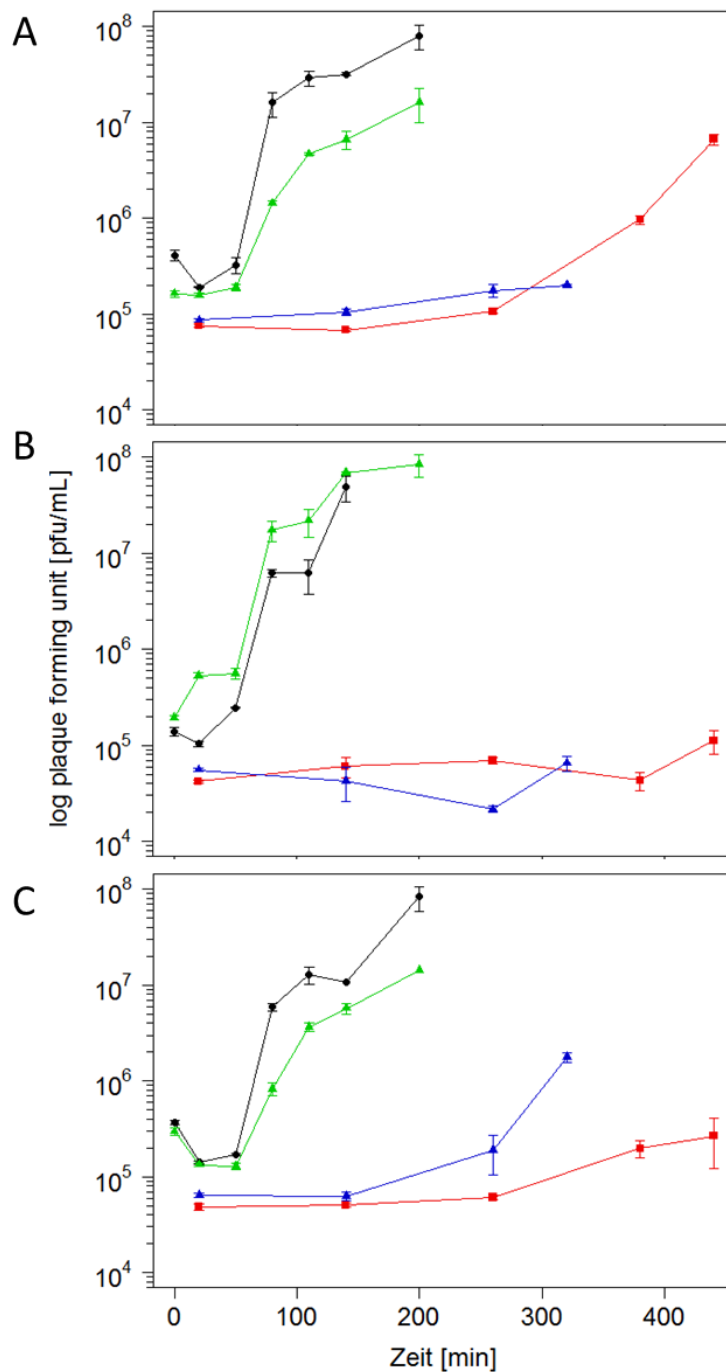


Abbildung 15: Infektionsverhalten der freien im Vergleich zu den immobilisierten Phagen an Dynabeads® M-270 Epoxy. Die Phagen bzw. die Phagen-Nanopartikel (1×10^{12} pfu/mL zur Immobilisierung an Dynabeads® M-270 Epoxy eingesetzt) wurden zusammen mit *P. aeruginosa* bei 37 °C inkubiert (siehe Kap. 2.2.14). In Kontrolle 1 wurden die Phagen allein und in Kontrolle 2 wurden die Phagen zusammen mit dem sterilfiltrierten Überstand von *P. aeruginosa* inkubiert. **Schwarz:** freie Phagen; **Grün:** immobilisierte Phagen; **Rot:** Kontrolle 1 (Inkubation der immobilisierten Phagen ohne *P. aeruginosa*); **Blau:** Kontrolle 2 (Inkubation der immobilisierten Phagen ohne *P. aeruginosa* im sterilfiltrierten Überstand einer *P. aeruginosa*-Kultur); **A:** JG012; **B:** JG024; **C:** JG054. Die angegebenen Titer geben die Gesamtheit der eingesetzten sowie freigesetzten Phagen bzw. der eingesetzten immobilisierten Nanopartikel sowie der freigesetzten Phagen wieder. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Darstellung erfolgte mit der Software R (siehe Anhang; R Core Team 2016).

Bei dem gebundenen Phagen JG024 konnte innerhalb der ersten 20 min keine Reduzierung des Phagentiters beobachtet werden. Zudem konnte nach ca. 80 min (Plateau) ein höherer Titer im Vergleich zu den freien Phagen von ca. 2×10^7 pfu/mL detektiert werden. Bei den Kontrollversuchen konnte für den Phagen JG012 innerhalb von ca. 5 h keine Ablösung der Phagen beobachtet werden. Erst nach ca. 6 h stieg der Phagentiter durch die Ablösung der Phagen an. Im Fall des Phagen JG054 lösten sich nach ca. 6 h bei der Kontrolle 1 und nach ca. 4 h bei der Kontrolle 2 geringe Mengen an Phagen ab. Bei dem Phagen JG024 hingegen konnte innerhalb von 7 h keine Ablösung der Phagen detektiert werden. Die Kurvenverläufe der Kontrolle 1 und Kontrolle 2 zeigten bei den jeweiligen Phagen keine Unterschiede. Diese Befunde legen nahe, dass die Ablösung der Phagen nicht auf von *P. aeruginosa* produzierte extrazelluläre Stoffe zurückzuführen ist. Eine mögliche Ursache könnten nicht kovalent an die Oberfläche gebundene Phagen sein. Neben der kovalenten Bindung von Phagen an Oberflächen ist es ebenfalls möglich Phagen durch physikalische Adsorption zu binden. Dies kann aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen oder Ladungsunterschieden der Phagen und des Materials erfolgen (siehe Kap. 1.1.6). Durch die schwächere physikalische Adsorption könnte es zur Ablösung dieser Phagen im Verlauf der Inkubation kommen. Allerdings konnte eine Ablösung der Phagen erst nach ca. 4 bzw. 6 h detektiert werden. Die Dauer eines Infektionszyklus konnte hingegen bei ca. 80 bzw. 110 min beobachtet werden. Demzufolge resultierten die detektierten Phagen, aus dem Wachstumsexperiment der Partikel-gebundenen Phagen, aus der Infektion des Wirtes. Somit konnte gezeigt werden, dass alle drei Phagen im immobilisierten Zustand weiterhin fähig sind ihren Wirt zu infizieren. Im Vergleich zu den freien Phagen konnte lediglich eine geringe Reduzierung an freigesetzten Phagen beobachtet werden. Die Phagen könnten so an die Nanopartikel gebunden haben, dass eine Infektion des Wirtes aufgrund von eingeschränkter Mobilität erschwert wird. Auf diese Weise wäre die Zahl der infizierenden Phagen geringer und somit ebenfalls die Zahl der neugebildeten Phagen. Bei dem immobilisierten Phagen JG024 konnte am Anfang des Infektionszyklus keine Reduzierung des Titers beobachtet werden, die auf Grund der Adsorption der Phagen an den Wirt resultieren sollte. Die ermittelten

Titer der immobilisierten Phagen beziehen sich nicht auf die Konzentration einzelner Phagen, sondern auf die der Phagen-Nanopartikel/mL. Je Nanopartikel können bis zu 1.000 Phagen gebunden sein (vgl. Kap. 3.1.11), die nicht gleichzeitig ein Bakterium infizieren können. Aufgrund dessen können nach der Infektion einzelner Phagen noch funktionsfähige Phagen an den Nanopartikeln immobilisiert vorliegen und entsprechend nachgewiesen werden. Deshalb nehmen trotz erfolgter Infektion des Wirtes die Titer der immobilisierten Nanopartikel nicht ab. Es konnte anhand der Wachstumsexperimente beobachtet werden, dass sich die Infektionszyklen der Phagen JG012 und JG054 ähneln. Innerhalb der ersten 20 min konnte eine Reduktion des Titors sowie das Maximum der freigesetzten Phagen nach ca. 110 min beobachtet werden. Der Phage JG024 zeigte einen kürzeren Infektionsverlauf von ca. 80 min und somit eine effizientere Vermehrung der Phagen. Zusammengefasst konnte eine zu den freien Phagen vergleichbare Infektiosität der an die Dynabeads® M-270 Epoxy immobilisierten Phagen gezeigt werden.

3.1.12 Infektion von *P. aeruginosa* in Proben durch Nanopartikel-immobilisierte Phagen auf einem Filter

In den ersten Schritten des Diagnostik-Systems wird die zu untersuchende Probe mit den immobilisierten Phagen versetzt, inkubiert und im Anschluss durch einen Filter gegeben. Die Separierung der Phagen mittels Filter erwies sich als effektivere Methode im Vergleich zur magnetischen Separierung. Während dieser Schritte können experimentelle Fehler auftreten oder Probenmaterial verloren gehen, das einen Einfluss auf die Ergebnisse des Diagnostik-System haben kann. Deshalb sollten zur vereinfachten Diagnose die immobilisierten Phagen bereits auf einem porösen Filter vorliegen. Der Verbraucher gibt mit Hilfe einer Spritze sein Probenmaterial auf diesen Filter und inkubiert diesen. Im Anschluss wird ein definiertes Volumen eines Puffers durch den Filter gedrückt und das Filtrat aufgefangen. Die darin enthaltenen freigesetzten Phagen können nach entsprechender Weiterbehandlung mittels LFD nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 4). Zunächst wurde das Infektionsverhalten der immobilisierten Phagen auf einem porösen Filter überprüft (siehe Kap. 2.2.15). Dazu wurden wie im vorigen Experiment (vgl.

Abbildung 15) die an die Dynabeads® M-270 Epoxy immobilisierten Phagen JG012, JG024 und JG054 mit *P. aeruginosa* auf einem porösen Filter (0,2 µm) inkubiert. Zudem erfolgten Kontrollen zur Überprüfung möglicher Ablösungen der Phagen von den Dynabeads® M-270 Epoxy durch die Inkubationsbedingungen oder durch von *P. aeruginosa* produzierten extrazellulären Produkten. Dazu wurden zum einen nur die immobilisierten Phagen auf dem Filter inkubiert (Kontrolle 1) und zum anderen die immobilisierten Phagen mit einem steriltrifrierten Überstand einer *P. aeruginosa*-Kultur inkubiert (Kontrolle 2) (Kap. 2.2.15). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 16 dargestellt. Zum Vergleich wurde der Verlauf der Infektion der freien und immobilisierten Phagen in Flüssigkultur ebenfalls dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit mit der Filterkultivierung wurde nur der Titer der freigesetzten Phagen aufgeführt. Für alle drei Phagen konnte während der Inkubation mit *P. aeruginosa* auf dem Filter eine Zunahme des Titers beobachtet werden. Im Vergleich zur Inkubation in Flüssigkultur (frei und gebunden) stieg die Zahl der freigesetzten Phagen jedoch nur langsam an. Trotzdem konnten nach einer dreistündigen Inkubation hohe Titer erreicht werden, die annähernd den Titern aus der Inkubation in Flüssigkultur entsprechen. Bei dem Phagen JG012 konnte ein Titer von ca. 2×10^6 pfu/mL auf dem Filter und ca. 8×10^7 pfu/mL (freie Phagen) bzw. ca. 1×10^7 pfu/mL (gebundene Phagen) in Flüssigkultur detektiert werden. Für den Phagen JG054 konnten Titer von ca. 3×10^6 pfu/mL auf dem Filter und ca. 8×10^7 pfu/mL (freie Phagen) bzw. ca. 1×10^7 pfu/mL (gebundene Phagen) in Flüssigkultur bestimmt werden. Der Phage JG024 erreichte einen Titer von ca. 2×10^7 pfu/mL im Vergleich zu ca. $8,4 \times 10^7$ pfu/mL der freien Phagen in Flüssigkultur. Somit konnten die Nanopartikel-immobilisierten Phagen erfolgreich *P. aeruginosa* auf dem Filter infizieren.

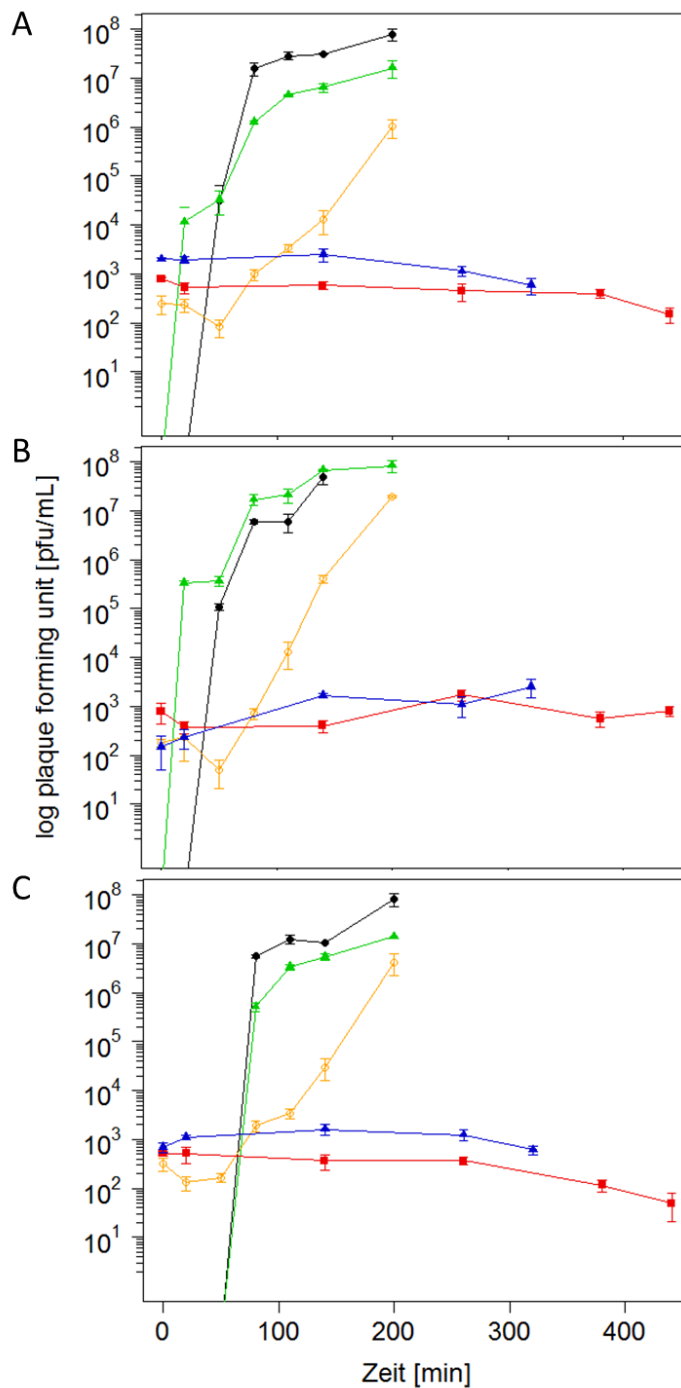


Abbildung 16: Infektionsverhalten der freien und immobilisierten Phagen JG012, JG024 und JG054 (Dynabeads® M-270 Epoxy) im Vergleich zur Kultivierung auf einem porösen Filter. Die Phagen bzw. die Phagen-Dynabeads (1×10^{12} pfu/mL zur Immobilisierung an Dynabeads® M-270 Epoxy eingesetzt) wurden zusammen mit *P. aeruginosa* bei 37 °C inkubiert (siehe Kap. 2.2.14 und 2.2.15). In Kontrolle 1 wurden die Phagen allein inkubiert und in Kontrolle 2 wurden die Phagen zusammen mit dem steriltfiltrierten Überstand einer *P. aeruginosa* Kultur inkubiert. Dargestellt sind die Titer der freigesetzten Phagen. **Schwarz:** freie Phagen; **Grün:** immobilisierte Phagen; **Orange:** immobilisierte Phagen auf einem Filter; **Rot:** Kontrolle 1 (Inkubation der immobilisierten Phagen ohne *P. aeruginosa*); **Blau:** Kontrolle 2 (Inkubation der immobilisierten Phagen ohne *P. aeruginosa* im steriltfiltrierten Überstand einer *P. aeruginosa*-Kultur); **A:** JG012; **B:** JG024; **C:** JG054. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Darstellung erfolgte mit der Software R (siehe Anhang; R Core Team 2016).

Die verzögerte Zunahme der freigesetzten Phagen könnte auf eine noch zusätzlich eingeschränkte Mobilität der Phagen zurückzuführen sein. Aufgrund dessen, dass die Phagen und *P. aeruginosa* auf einem Filter vorlagen, war die Wahrscheinlichkeit eines Zusammentreffens reduziert. Trotzdem konnten nach einer dreistündigen Inkubation ähnliche Mengen an freigesetzten Phagen im Vergleich zur Inkubation in Flüssigkultur erreicht werden. Demzufolge findet die Infektion auf dem Filter nur zeitverzögert statt. Weiterhin konnten bereits zu Beginn der Inkubation der Phagen auf dem Filter sowie während der gesamten Inkubation der Kontrollansätze freigesetzte Phagen detektiert werden (ca. 1×10^3 pfu/mL). Dies deutet darauf hin, dass sich die Phagen von den Nanopartikeln ablösen. Ein gleichbleibender Titer in den Kontrollen bedeutet eine konstante Ablösung der Phagen. Die Ursache könnte in physikalisch adsorbierten Phagen liegen, die durch hydrophobe Wechselwirkungen oder Ladungsunterschieden der Phagen und des Materials erfolgen (vgl. Kap. 3.1.11; 1.1.6). Durch die schwächere physikalische Adsorption könnte es zur konstanten Ablösung dieser Phagen während der Inkubation kommen. Es konnten keine Unterschiede zwischen der Kontrolle 1 und Kontrolle 2 während der Inkubation beobachtet werden (Abbildung 16). Somit ist die Ablösung der Phagen von den Nanopartikeln nicht auf von *P. aeruginosa* extrazellulär produzierten Produkten zurückzuführen (vgl. Kap. 3.1.11). Es konnte gezeigt werden, dass immobilisierte Phagen *P. aeruginosa* auf einem Filter infizieren können. Darüber kann die Durchführung des Diagnostik-Systems vereinfacht werden.

3.1.13 Reduzierung der Ablöserate der Phagen von den Nanopartikeln

Durch das Diagnostik-System sollen lebende *P. aeruginosa* Bakterien mittels Phagen nachgewiesen werden. Dabei dient die Detektion von aus einer Infektion resultierenden freigesetzten Phagen als Indikator für die Präsenz von lebenden *P. aeruginosa* Bakterien. Durch die Filtration der Probe werden die freigesetzten Phagen separiert und so nachgewiesen. Aufgrund der beobachteten Ablösung der Phagen von den Nanopartikeln muss eine entsprechende Anpassung des Detektions-Systems erfolgen, so dass es über die sich ablösenden Phagen zu keinem falsch-positiven Resultat kommt.

Deshalb wurde der Zusammenhang zwischen der Menge an immobilisierten Phagen mit der resultierenden Ablöserate systematisch untersucht. Dazu wurden Phagen-Konzentrationen von 1×10^6 , 1×10^8 , 1×10^{10} und 1×10^{12} pfu/mL für die Immobilisierung an den Dynabeads® M-270 Epoxy verwendet (Kap. 2.3.1.1). Parallel wurden Kontrollen angefertigt, um mögliche Beeinflussungen der Immobilisierungsreagenzien auf die Phagen zu beobachten. Dazu wurden die Phagen ohne den Nanopartikeln mit den Immobilisierungspuffern inkubiert. Dabei wurden bei geringen Phagentitern ($< 1 \times 10^{10}$ pfu/mL) nach der Inkubation weniger Phagen detektiert als zuvor eingesetzt. Bei der Immobilisierung von JG012 wurden z. B. 1×10^8 pfu/mL eingesetzt und nach der Behandlung mit den Immobilisierungs-reagenzien konnte nur noch ein Titer von $4,6 \times 10^3$ pfu/mL in der Kontrolle detektiert werden. Eine Inaktivierung der Phagen durch die Immobilisierungs-reagenzien kann ausgeschlossen werden. Bei der Inkubation der Immobilisierungs-reagenzien mit Phagen-Konzentrationen $> 1 \times 10^{10}$ pfu/mL konnte keine Abnahme des Titers beobachtet werden (vgl. Tabelle 30 und Tabelle 31). Also sollten geringe Phagen-Konzentrationen ebenfalls nicht inaktiviert werden. Eine Möglichkeit für die Reduzierung des Phagentiters wären unspezifische Bindungen der Phagen an der Gefäßwand. Aufgrund der geringen verwendeten Phagen-Konzentrationen könnten sich diese unspezifischen Adsorptionen bemerkbar machen (Weiß *et al.*, 2010). Zur Vermeidung dieser unspezifischen Bindungen wurden verschiedene Reagenzien in unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Dazu wurde der Phage JG012 (1×10^8 pfu/mL), ohne Nanopartikel, mit den Immobilisierungspuffern und den zu testenden Reagenzien inkubiert und mittels Plaqueassay ausgewertet. Es wurde BSA als Protein zur Sättigung möglicher unspezifischer Bindungen und das Detergenz Tween20 zur Vermeidung unspezifischer hydrophober Wechselwirkungen eingesetzt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 32 zusammengefasst.

Tabelle 32: Test zur Reduzierung unspezifischer Bindungen mit der Gefäßwand.

Der Phage JG012 wurde mit einer Konzentration von 1×10^8 pfu/mL mit den Immobilisierungspuffern A und B (Kap. 2.3.1.1) und verschiedenen Reagenzien inkubiert. Die Titer wurden mittels Plaqueassays bestimmt (Kap. 2.2.9).

Reagenz	pfu/mL
0,10 % BSA	$1,1 \times 10^8$
0,50 % BSA	$6,6 \times 10^7$
1,00 % BSA	$7,3 \times 10^7$
0,05 % Tween20	$6,0 \times 10^5$
0,50 % Tween20	$3,3 \times 10^6$
1,00 % Tween20	$6,8 \times 10^7$
0,10 M Tris-HCl	$3,0 \times 10^2$
-	$4,6 \times 10^3$

Ohne die Verwendung eines der beiden Reagenzien konnte von den ursprünglich eingesetzten 1×10^8 pfu/mL nur noch ca. $4,6 \times 10^3$ pfu/mL nachgewiesen werden. Diese Konzentration konnte durch die Verwendung von BSA auf bis zu 1×10^8 pfu/mL und von Tween20 auf $6,8 \times 10^7$ pfu/mL erhöht werden. Somit konnte gezeigt werden, dass BSA und Tween20 eine Adsorption der Phagen an die Gefäßwand verhindern. Zudem zeigte die Verwendung von 0,1 % BSA die besten Ergebnisse und wird daher für die folgenden Anwendungen eingesetzt.

Nach der erfolgreichen Immobilisierung auch geringer Phagen-Konzentrationen wurde die Ablöserate in Wachstumsexperimenten bestimmt. Dazu wurden die verschieden beladenen Phagen-Nanopartikel (Nanopartikel an denen die Phagen immobilisiert wurden) auf einem Filter inkubiert (ohne *P. aeruginosa*-Zellen) (vgl. Kap. 2.2.15). Im Anschluss wurden die abgelösten Phagen mittels Plaqueassay bestimmt. Aufgrund dessen, dass sich die Phagen JG012 und JG054 bezüglich der Immobilisierung (vgl. Tabelle 31) und ihrem Infektionsverhalten (vgl. Abbildung 15; Kap. 3.1.11) ähneln, wurden für die folgenden Versuche nur die Phagen JG012 und JG024 eingesetzt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 17 dargestellt. Aufgrund von zu geringen Mengen an gebundenen Nanopartikeln bei der Immobilisierung von 1×10^6 pfu/mL (Phagen) wurden nur die Immobilisierungen mit Phagen-Konzentrationen ab 1×10^8 pfu/mL verwendet. Weiterhin wurden verschiedene

initiale Phagen-Nanopartikel Konzentrationen für die Kultivierung getestet: 1×10^3 Phagen-Nanopartikel/mL und 1×10^4 Phagen-Nanopartikel/mL.

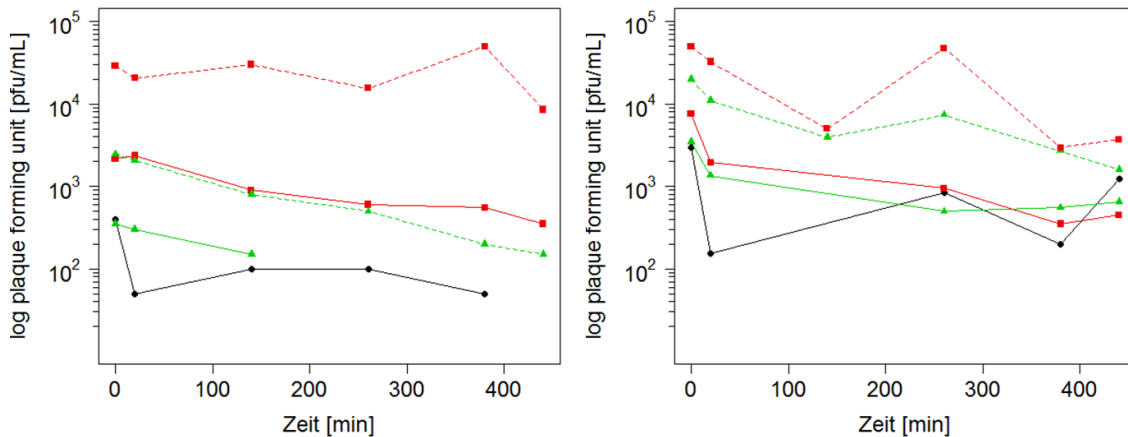


Abbildung 17: Bestimmung der Ablöserate der Phagen JG012 und JG024 von den Dynabeads® M-270 Epoxy, wobei verschiedene Phagen-Konzentrationen immobilisiert wurden.

Die Immobilisierung erfolgte nach Herstellerangaben (siehe Kap. 2.3.1), wobei verschiedene Phagen-Konzentrationen eingesetzt wurden. Die Überprüfung der Ablöserate erfolgte durch die Kultivierung der Phagen-Nanopartikel allein (Kontrolle 1) auf einem porösen Filter (siehe Kap. 2.2.15). Der Phagentiter wurde mittels Plaqueassay bestimmt (siehe Kap. 2.2.9). **Schwarz:** 1×10^8 pfu/mL; **Grün:** 1×10^{10} pfu/mL; **Rot:** 1×10^{11} pfu/mL (JG024) bzw. 1×10^{12} pfu/mL (JG012). Des Weiteren wurden zwei verschiedene Konzentrationen an Phagen-Nanopartikel für die Kultivierung eingesetzt. **Durchgezogene Linie:** 1×10^3 Phagen-Nanopartikel/mL; **gestrichelte Linie:** 1×10^4 Phagen-Nanopartikel/mL. **A:** JG012; **B:** JG024. Die Darstellung erfolgte mit der Software R (siehe Anhang; R Core Team 2016).

Bei dem Phagen JG012 und JG024 konnten höhere Ablöseraten bei einer initialen Konzentration von 1×10^4 Phagen-Nanopartikel/mL (Abbildung 17 gestrichelte Linie) im Vergleich zur niedrigeren initialen Phagen-Nanopartikel Konzentration (Abbildung 17 durchgezogene Linie) beobachtet werden. Der Unterschied betrug jeweils ca. eine Zehnerpotenz. Somit steigt die Ablöserate proportional zur initialen Konzentration an Phagen-Nanopartikeln. Eine initiale Konzentration von 1×10^3 Phagen-Nanopartikel/mL und die Immobilisierungen bei denen Phagen-Konzentrationen (JG012) von 1×10^8 pfu/mL und 1×10^{10} pfu/mL verwendet wurden, resultierten in einer Ablösung der Phagen in einem Bereich von ca. 1×10^2 pfu/mL. Bei der Immobilisierung mit 1×10^{12} pfu/mL konnten ca. 1×10^3 pfu/mL an abgelösten Phagen detektiert werden. Bei den Phagen JG024 konnten bei allen Immobilisierungen ca. 1×10^3 pfu/mL an abgelösten Phagen beobachtet werden. Um jeweils eine Zehnerpotenz höher waren die Konzentrationen der sich ablösenden Phagen bei einer initialen

Konzentration von 1×10^4 Phagen-Nanopartikel/mL. Somit steigt die Ablöserate mit zunehmender Konzentration an gebundenen Phagen an den Nanopartikeln. Dabei konnten bei dem Phagen JG012 Ablöseraten in einem Bereich von ca. $1 \times 10^2 - 1 \times 10^4$ pfu/mL und für den Phagen JG024 von ca. $1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ pfu/mL bestimmt werden.

3.1.14 Dynabeads® M-280 Streptavidin

Im vorigen Kapitel konnte der Zusammenhang zwischen der Menge an immobilisierten Phagen mit der resultierenden Ablöserate gezeigt werden. Dabei wurden keine Bedingungen gefunden, die eine Ablösung der Phagen vermeiden. Aufgrund dessen wurde nach weiteren Möglichkeiten der stabilen Immobilisierung der Phagen auf Nanopartikeln gesucht. Karpenko (2011) konnte bereits die erfolgreiche Biotinylierung von Viren und die anschließende Bindung an Dynabeads® M-280 Streptavidin zeigen. Die Biotinylierung ist eine einfache und weitverbreitete Methode zur Markierung von Biomolekülen für deren Affinitätsreinigung. Biotin bindet kovalent an Streptavidin, wodurch eine hohe Bindungseffizienz von biotinylierten Phagen an Dynabeads® M-280 Streptavidin erzielt werden könnte. Die Phagen JG012 und JG024 wurden biotinyliert und an Dynabeads® M-280 Streptavidin immobilisiert (siehe Kap. 2.3.1.4; 2.3.2). Zur Biotinylierung der Phagen wurden verschiedene Biotine getestet. EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin reagiert mit primären Aminen und besitzt ein sehr kurzes Trägermolekül (*spacer-arm*) mit 13,5 Ångström. Sulfo-NHS-LC-Biotin reagiert mit Aminen und besitzt aber eine Trägermoleküllänge (*spacer-arm*), die mit 22,4 Ångström länger ist. Das Trägermolekül entscheidet über die Zugänglichkeit des Biotins zur Biotinbindestelle des Streptavidins. Die Sulfo-Gruppe der beiden Biotine erhöht die Wasserlöslichkeit. D-Biotin Succinimidyl Ester reagiert ebenfalls mit Aminen, besitzt aber kein Trägermolekül (*spacer-arm*). Biotin Ethylendiamin reagiert mit Aldehyden sowie Ketonen und N α -(3-maleimidylpropionyl)biocytin reagiert mit Thiolen (siehe Kap. 2.3.2). Während der Inkubation von N α -(3-maleimidylpropionyl)biocytin mit den Phagen-suspensionen konnte beobachtet werden, dass sich Präzipitate bildeten, die nicht wieder in Lösung gebracht werden konnten. Dieses Biotin wurde als ungeeignet betrachtet und für weitere Versuche nicht verwendet. Die restlichen

Biotine zeigten bei der Immobilisierung (mit 1×10^{10} pfu/mL) vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Menge an immobilisierten Nanopartikeln. Zudem konnten ähnliche Mengen an immobilisierten Nanopartikeln im Vergleich zur Immobilisierung der Phagen an Dynabeads® M-270 Epoxy erzielt werden. In Wachstumsexperimenten wurde die Menge der sich ablösenden Phagen von den Dynabeads® M-280 Streptavidin bestimmt. Dazu wurden die mit Phagen beladenen Nanopartikel ohne *P. aeruginosa* für 3 h inkubiert. Weiterhin wurden die immobilisierten Nanopartikel mit *P. aeruginosa* inkubiert und nach einer dreistündigen Inkubation die Zahl der freigesetzten, aus einer Infektion resultierenden Phagen ermittelt (Kap. 2.2.16). Dabei sollten mögliche Auswirkungen der verschiedenen Biotine auf die Bindungsstabilität der Phagen an den Dynabeads® M-280 Streptavidin und der Einfluss auf die Infektiosität der immobilisierten Phagen bestimmt werden. Es sollten hohe Titer am Ende der Inkubation erzielt werden, so dass ausreichend Material zur Detektion mittels des Detektions-Systems vorliegt. Bei allen getesteten Biotinen konnten vergleichbare Mengen von sich ablösenden Phagen beobachtet werden. Hinsichtlich des Endtiters konnten mit D-Biotin Succinimidyl Ester und Sulfo-NHS-LC-Biotin Titer von bis zu 1×10^5 pfu/mL (JG012) und 1×10^7 pfu/mL (JG024) erzielt werden. Für die Biotine EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin und Biotin Ethylendiamin konnten Endtiter von ca. 1×10^6 pfu/mL (JG012) und ca. 1×10^8 pfu/mL (JG024) bestimmt werden. Die Nutzung von EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin und Biotin Ethylendiamin zur Immobilisierung der Phagen erbrachte die besten Bedingungen für die Infektion des Wirtes, so dass hohe Endtiter erzielt werden konnten. Weiterhin auffällig war, dass mit dem Phagen JG024 bei allen Biotinen höhere Endtiter erreicht werden konnten. Das könnte darauf hinweisen, dass die Biotinylierung und anschließende Immobilisierung des Phagen JG012 an Stellen erfolgte, die eine Infektion des Wirtes erschweren. Demzufolge kann es zu einer Verzögerung der Infektion kommen. Aufgrund der erzielten Ergebnisse wurde EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin für die weiteren Versuche eingesetzt.

Im nächsten Schritt wurden verschiedene Phagen-Konzentrationen an Dynabeads® M-280 Streptavidin immobilisiert und in Wachstumsexperimenten bezüglich des Endtiters und der Ablöserate untersucht (siehe Kap. 2.2.16).

Dabei sollten optimale Bedingungen für das Erreichen eines hohen Endtiters und gleichzeitig niedriger Ablöserate bestimmt werden. Die Problematik bezüglich der sich ablösenden Phagen besteht darin, dass es bei einem Nachweis dieser Phagen durch das Diagnostik-System zu falsch-positiven Ergebnissen kommen kann. Im Diagnostik-System werden die Phagen mit der Probe inkubiert und die freigesetzten Phagen separiert. Im Anschluss werden die Phagen aufkonzentriert, die DNA isoliert und mittels PCR amplifiziert, so dass diese durch die LFD-Technologie nachgewiesen werden kann. Dabei zeigen nur die neugebildeten Phagen die Präsenz lebender *P. aeruginosa* Bakterien an. Durch die Konfiguration der PCR (Reduktion der Zyklenzahl) ist es möglich Phagen erst ab einer bestimmten Konzentration nachzuweisen. Dabei sollten die abgelösten Phagen unterhalb dieser Nachweisgrenze liegen und die aus einer Infektion resultierenden darüber. Aufgrund dessen sollten Bedingungen ermittelt werden, in denen sich geringe Mengen an Phagen ablösen und große Mengen an freigesetzten Phagen (aus der Infektion der nachzuweisenden *P. aeruginosa* Zellen) resultieren. Dieser Unterschied erlaubt einen gewissen Spielraum der PCR, so dass eindeutige Ergebnisse erzielt werden können. Zudem kann bei einer großen Menge an freigesetzten Phagen eine kurze Amplifikationsdauer gewählt werden, dass wiederum die Anwendungsdauer des gesamten Diagnostik-Systems verkürzt. Die Ergebnisse der Dynabeads® M-280 Streptavidin sowie der gleichbehandelten Dynabeads® M-270 Epoxy zum Vergleich, sind in der Abbildung 18 dargestellt. Für die Immobilisierung wurden verschiedene Phagen-Konzentrationen von 1×10^7 – 1×10^{10} pfu/mL eingesetzt. Zudem wurden verschiedene initiale Phagen-Nanopartikel Konzentrationen getestet: 1×10^3 Phagen-Nanopartikel/mL und 1×10^4 Phagen-Nanopartikel/mL.

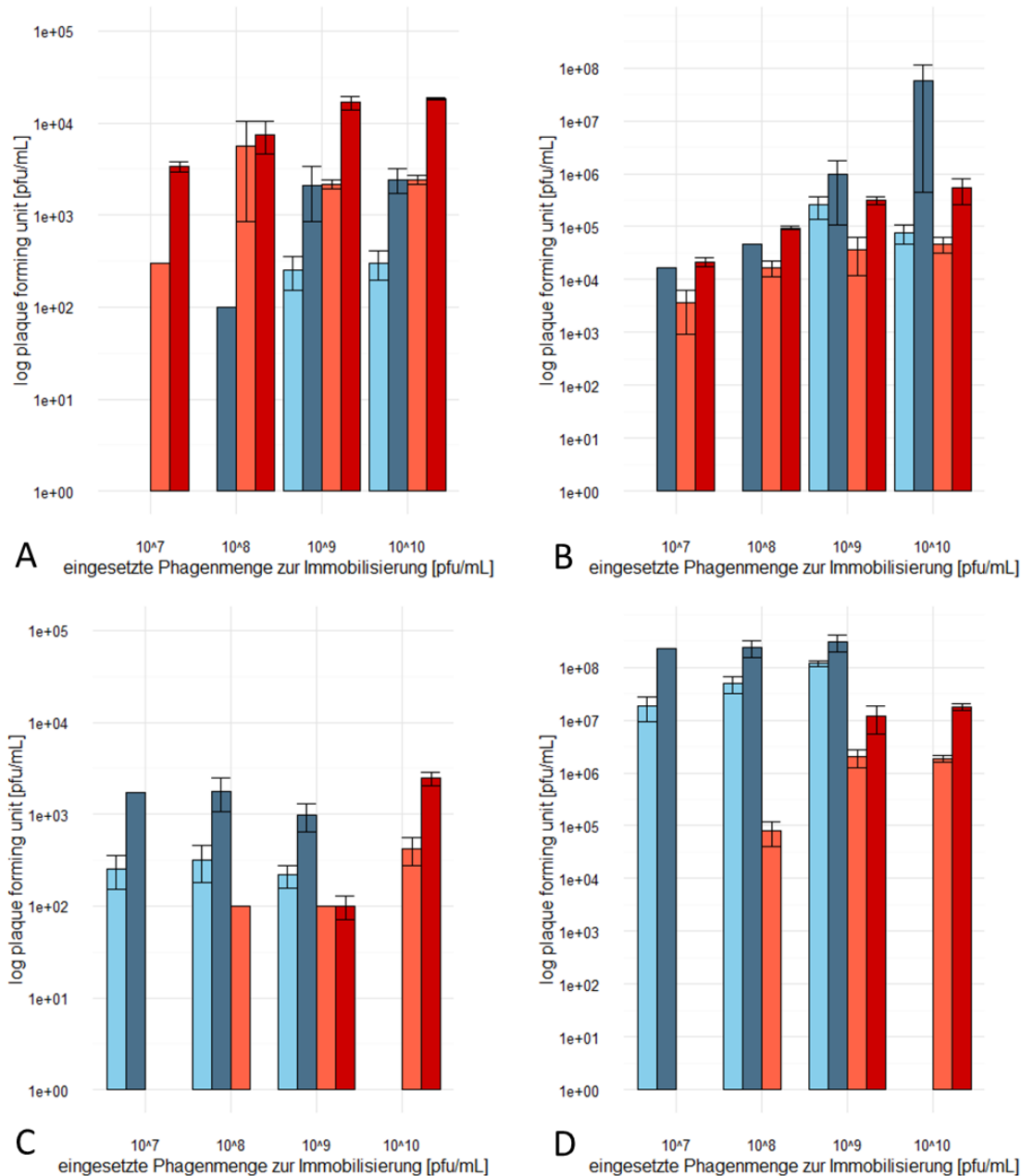


Abbildung 18: Vergleich der Infektiosität und Ablöserate der Phagen JG012 und JG024 von den Dynabeads® M-270 Epoxy und Dynabeads® M-280 Streptavidin.

Die Phagen-Nanopartikel wurden für 3 h mit (Wachstumsexperiment) bzw. ohne (Ablöserate) *P. aeruginosa* inkubiert. Anschließend wurde die Kultur durch einen porösen Filter gegeben und der Titer der freigesetzten Phagen bestimmt (siehe Kap. 2.2.17; 2.2.9). **A:** Ablöserate JG012; **B:** Wachstumsexperiment JG012; **C:** Ablöserate JG024; **D:** Wachstumsexperiment JG024; **Blau:** Dynabeads® M-270 Epoxy; **Rot:** Dynabeads® M-280 Streptavidin. Zudem wurden zwei verschiedene Phagen-Nanopartikel Konzentrationen für die Kultivierung eingesetzt. **Hell:** 1×10^3 pfu/mL; **Dunkel:** 1×10^4 pfu/mL. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Darstellung erfolgte mit der Software R (siehe Anhang; R Core Team, 2016).

Bei dem Phagen JG012 (Abbildung 18 A, B) konnten höhere Ablöseraten von den Dynabeads® M-280 Streptavidin im Vergleich zu den Dynabeads® M-270 Epoxy beobachtet werden. Der Unterschied betrug ca. eine Zehnerpotenz. Bei

den Wachstumsexperimenten konnten mit den Dynabeads® M-270 Epoxy höhere Endtiter im Vergleich zu den Dynabeads® M-280 Streptavidin erzielt werden. Mit den Dynabeads® M-280 Streptavidin konnten bei den Immobilisierungen von 1×10^9 und 1×10^{10} pfu/mL ca. 2×10^4 pfu/mL an sich ablösenden und ca. 4×10^5 pfu/mL an freigesetzten Phagen ermittelt werden (bei 1×10^4 Phagen-Nanopartikel/mL). Bei den Dynabeads® M-270 Epoxy konnten bei der Immobilisierung von 1×10^{10} pfu/mL ca. 2×10^3 pfu/mL an sich ablösenden und ca. 8×10^7 pfu/mL an freigesetzten Phagen (Wachstumsexperiment) bestimmt werden (bei 1×10^4 Phagen-Nanopartikel/mL). Aufgrund des größeren Unterschieds zwischen der Konzentration der sich ablösenden und der neugebildeten Phagen konnten für den Phagen JG012 die besten Ergebnisse mit den Dynabeads® M-270 Epoxy, der Immobilisierung von 1×10^{10} pfu/mL und einer initialen Phagen-Nanopartikel Konzentration von 1×10^4 Phagen-Nanopartikel/mL erreicht werden. Unter diesen Bedingungen kann die PCR optimal konfiguriert werden. Der geringe Unterschied der sich ablösenden und neugebildeten Phagen bei den Dynabeads® M-280 Streptavidin könnte auf eine verminderte Infektion des Phagen JG012 zurückzuführen sein. Demnach könnte die Immobilisierung zu sterischen Problemen führen, die die Infektiosität des Phagen herabsetzen. Bei dem Phagen JG024 (Abbildung 18 C, D) konnten mit den Dynabeads® M-280 Streptavidin geringere Ablöseraten im Vergleich zu den Dynabeads® M-270 Epoxy erzielt werden. Die geringste Ablöserate (ca. 1×10^2) konnte mit der Immobilisierung von 1×10^9 pfu/mL erreicht werden. Die höchsten Endtiter konnten mit den Dynabeads® M-270 Epoxy erzielt werden. Allerdings konnte mit den Dynabeads® M-280 Streptavidin, der Immobilisierung von 1×10^9 pfu/mL und einer initialen Phagen-Nanopartikel Konzentration von 1×10^4 Phagen-Nanopartikel/mL ebenfalls ein hoher Endtiter von ca. 1×10^7 pfu/mL erreicht werden. Aufgrund der geringen erzielten Ablöserate und des großen Unterschieds zwischen den sich ablösenden und neugebildeten Phagen konnten unter diesen Bedingungen die besten Ergebnisse erzielt werden. Die erzielten Ergebnisse konnten zu folgenden Bedingungen kombiniert werden, die eine eindeutige Unterscheidung von sich ablösenden und neugebildeten Phagen mittels PCR erlauben. Die Immobilisierung des Phagen JG012 erfolgte

mit einem Titer von 1×10^{10} pfu/mL an die Dynabeads® M-270 Epoxy. Der Phage JG024 wurde mit einem Titer von 1×10^9 pfu/mL an die Dynabeads® M-280 Streptavidin immobilisiert. Als initiale Konzentration zur Inkubation der Nanopartikel mit *P. aeruginosa*, wurden 1×10^4 Phagen-Nanopartikel/mL eingesetzt.

3.1.15 Detektion der Phagen mittels *Lateral Flow Dipstick* (LFD) Technologie

Aufbauend auf diesen Ergebnissen erfolgte die Etablierung der Detektion der freigesetzten Phagen mittels LFD Technologie in Kooperation mit der Firma AMODIA Bioservice GmbH. Ein amplifikationsloser Nachweis der unbehandelten Phagen-DNA war nicht möglich, da sich gezeigt hat, dass lange DNA-Fragmente nicht über die Membran des LFD transportiert wurden. Erst nach einer Fragmentierung konnte diese mittels LFD nachgewiesen werden, jedoch nur bei sehr hohen DNA-Konzentrationen. Innerhalb des Diagnostik-Systems konnten solche DNA-Mengen bislang nicht erzielt werden, vor allem nicht im Hinblick auf den Nachweis von geringen *P. aeruginosa*-Keimzahlen. Eine Signalverstärkung durch sekundäre Antikörper brachte ebenfalls keine Verbesserung der Detektion (Ergebnis von Dr. Nina Diekmann, AMODIA Bioservice GmbH). Alternativ erfolgte die Entwicklung einer PCR-basierten Amplifikation der Phagen-DNA, wobei nur die neugebildeten Phagen resultierend aus einer Infektion nachgewiesen werden und nicht die sich abgelösten. Ebenso erfolgte die Entwicklung und Konstruktion Phagen-spezifischer DNA-Sonden sowie biotinylierter Primer zur Markierung der zu detektierenden Sequenz, so dass diese vom LFD erkannt wurde. Die Detektion mittels LFD basiert auf einem immunochromatographischen Verfahren. Während der Amplifizierung der Phagen-DNA wird das Produkt über spezifische Primer mit Biotin markiert (Kap. 2.4.6). Durch die anschließende Hybridisierung wird das Produkt zusätzlich mit 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) über eine Detektionssonde markiert (Kap. 2.4.7). Nach dem Auftrag der Probe auf den LFD, wird dieser in einen Chromatographie Puffer gestellt und nach Prinzipien der Dünnschichtchromatographie getrennt. Durch die Kapillarkräfte wird die Flüssigkeit mit der Probe entlang des Streifens transportiert. Dort

passiert die Probe eine Schicht mit eingetrockneten Goldpartikeln. Die daran gebundenen Antikörper erkennen die 6-FAM-Markierungen der Probe und werden nach erfolgter Bindung mit über den LFD transportiert. Auf der Membran ist weiterhin eine Linie mit Markerproteinen aufgebracht, die das aufgetrennte PCR-Produkt nachweisen sollen. Diese „Fängerlinie“ besteht aus Streptavidin und bindet das PCR-Produkt über dessen Biotin-Markierung. Durch die Aufkonzentrierung der an der Probe bereits gebundenen Goldpartikel erscheint eine sichtbare Linie auf dem LFD. Diese Linie erscheint nur, wenn an dem zu detektierenden Produkt beide Markierungen (Biotin durch Primer und 6-FAM durch Detektionssonde) gebunden sind. Dadurch wird eine doppelte Absicherung erreicht.

Auf Grundlage dieser Vielzahl an optimierten Parametern erfolgte die Etablierung des Diagnostik-Systems zunächst nur mit dem Phagen JG024. Zusammenfassend konnte in Zusammenarbeit mit der AMODIA Bioservice GmbH eine JG024-spezifische PCR und anschließende Hybridisierungsreaktion entwickelt sowie die Sensitivität des LFD verbessert werden.

3.1.16 Etablierte Parameter des Diagnostik-Systems

In Zusammenarbeit mit AMODIA Bioservice GmbH erfolgte die Kombination der Einzelkomponenten zum eigentlichen Diagnostik-System auf Grundlage des Phagen JG024. Als Ausgangsmaterial wurden mittels PEG-Präzipitation aufkonzentrierte und durch CsCl-Dichte-Gradienten-Zentrifugation aufgereinigte Suspensionen des Phagen JG024 verwendet (Kap. 2.2.8). Für die Immobilisierung von JG024 wurden Dynabeads® M-280 Streptavidin verwendet, wobei die zuvorige Biotinylierung mit 1 mg/mL EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin erfolgte (Kap. 2.3.1.4; 2.3.2). Es wurden 1×10^9 pfu/mL an Phagen immobilisiert und eine initiale Konzentration von 1×10^4 Phagen-Nanopartikel/mL für die Detektion der *P. aeruginosa* Bakterien eingesetzt (Kap. 3.1.14). Die Inkubation der Phagen-Nanopartikel mit *P. aeruginosa* erfolgte in Flüssigkultur und nicht wie zuvor getestet auf einem porösen Filter.

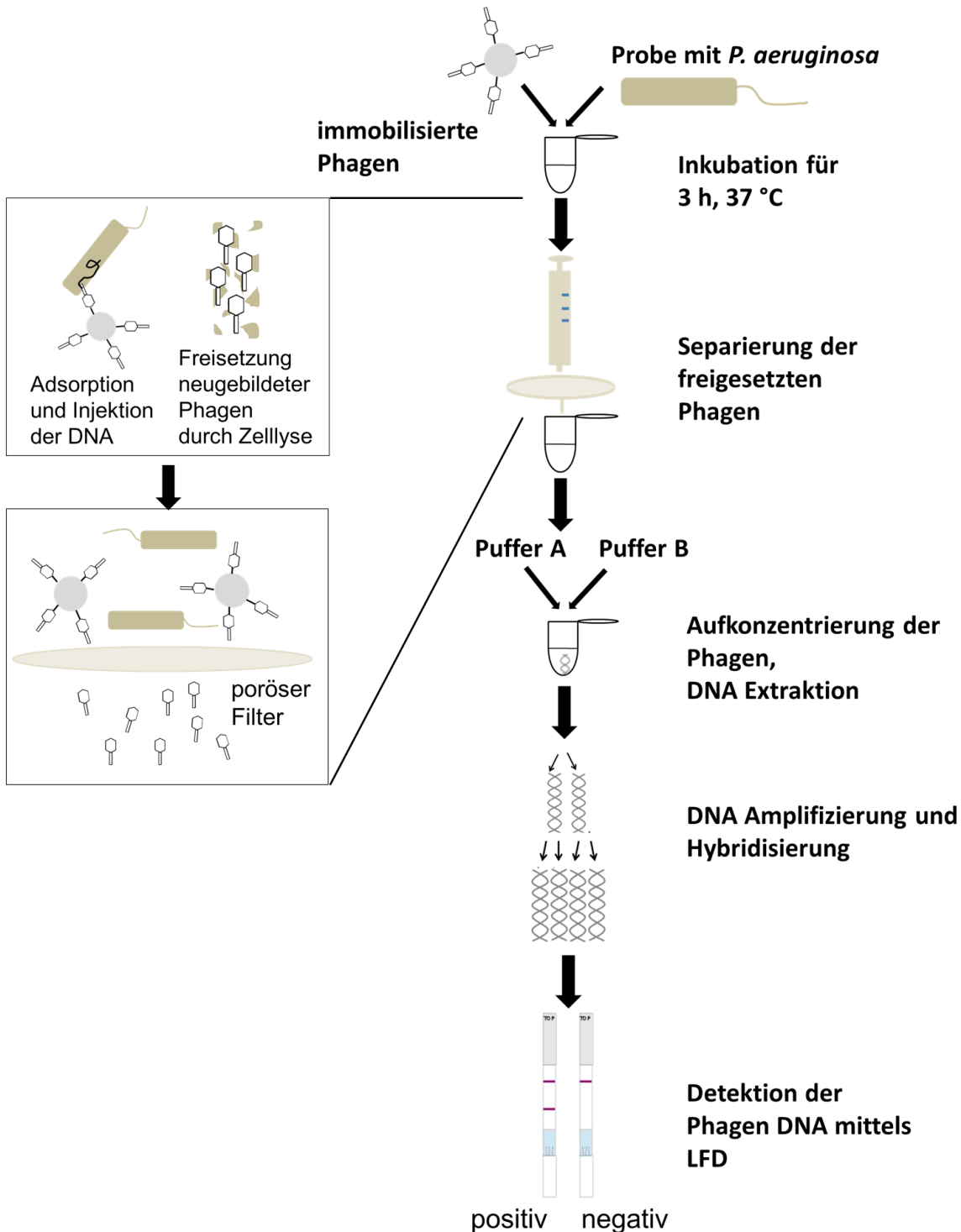


Abbildung 19: Ablauf des etablierten Detektions-Systems zum Nachweis lebender *P. aeruginosa*-Bakterien mittels Phagen.

Die immobilisierten Phagen werden mit der zu untersuchenden Probe vermengt und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgt die Separierung der freigesetzten Phagen durch einen porösen Filter und die Aufkonzentrierung der Phagen durch die Zugabe eines Fällungsreagenz für 30 min bei 4 °C. Von den im Zielorganismus neu gebildeten Phagen wird die DNA isoliert. Im Anschluss wird die DNA amplifiziert (PCR; siehe Tabelle 12) und mit Detektionssonden hybridisiert (Kap. 2.4.7). Zuletzt erfolgt die Detektion mittels LFD (Kap. 2.2.17).

Wie in Kap. 3.1.12 dargestellt wurde, zeigten die immobilisierten Phagen, die mit *P. aeruginosa* auf einem Filter inkubiert wurden, eine geringere Infektiosität und somit einen geringeren Endtiter als in Flüssigkultur. Für die Detektion mittels LFD ist jedoch ein möglichst hoher Phagen-Endtiter von Vorteil. Eine Übersicht vom Ablauf des Diagnostik-Systems zum Nachweis lebender *P. aeruginosa* Bakterien durch Phagen ist in der Abbildung 19 dargestellt. Die immobilisierten Phagen werden mit der zu untersuchenden Probe für 3 h bei 37 °C inkubiert. Die freigesetzten Phagen werden durch Filtration (0,2 µm Filter) von dem Rest der Probe separiert und durch Zugabe eines Fällungsreagenz für 30 min bei 4 °C aufkonzentriert. Die DNA-Isolierung erfolgt durch Zugabe von jeweils 50 µL Lysisreagenz und Neutralisierungspuffer für 15 min bei 95 °C (Kap. 2.2.17). Mittels PCR wird die DNA amplifiziert und mit spezifischen Detektionssonden hybridisiert (Tabelle 11 und Tabelle 12; Kap. 2.4.7). Die Detektion erfolgt mittels LFD. Dazu werden 10 µL des Reaktionsansatzes auf den LFD getropft und für ca. 20 min in einen Chromatographie-Puffer gestellt. Im Anschluss kann das Resultat direkt vom LFD abgelesen werden, wobei das Erscheinen einer zweiten Bande, neben der Kontrollbande, als positiv gewertet wird (Kap. 2.2.17).

3.1.17 Verifizierung des neu entwickelten Diagnostik-Systems an kontaminierter Kosmetik

Zur Verifizierung des etablierten Diagnostik-Systems zum Nachweis lebender *P. aeruginosa* Bakterien mittels Phagen (siehe Kap. 3.1.16) wurden verschiedene Bedingungen überprüft. Mit diesem System sollten ausschließlich Phagen nachgewiesen werden, die aus einer Infektion von *P. aeruginosa* Bakterien resultieren. Dazu wurden Proben mit *P. aeruginosa* Bakterien kontaminiert und als Kontrolle nicht kontaminierte Proben mitgeführt. Des Weiteren sollten nur lebende Bakterien nachgewiesen werden. Aufgrund dessen wurden Proben mit lebenden und hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* Bakterien versetzt (Kap. 2.2.6). Weiterhin sollte das Diagnostik-System in realen Proben wie Kosmetikprodukten Anwendung finden (Kap. 2.2.18). Dazu wurden drei verschiedene Kosmetikformulierungen getestet: Gesichtsscreme (Aok Tagespflege), Waschgel (Aok Bio Expert Waschgel) und Duschcreme (Fa

Joghurt Body Smoothie Granatapfel und Himbeere) der Firma Henkel (Düsseldorf, Deutschland). Zum Vergleich erfolgte die Anwendung des Diagnostik-Systems im artifiziell verkeimten Standard-Labormedium (CASO-Bouillon). Damit Schwankungen bezüglich verschiedener Phagen-Immobilisierungschargen ausgeschlossen werden können, wurden drei unabhängige Immobilisierungen von JG024 an die Dynabeads® M-280 Streptavidin im Standard-Labormedium (CASO-Bouillon) getestet. Die Durchführung erfolgte gemäß Kap. 2.2.17. In der Abbildung 20 sind die Ergebnisse der LFDs dargestellt. In den Proben mit lebenden *P. aeruginosa* Zellen (Test 1, 3, 7, 11, 13, 16, 19, 22, 25, 28) und der Positivkontrolle (Test 33) konnte eine spezifische Bande (mit Pfeil in der Abbildung 20 markiert) nachgewiesen werden. In den Kontrollansätzen ohne *P. aeruginosa* Zellen (Test 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30), den Proben mit hitzeinaktivierten Bakterienzellen (Test 14, 17, 20, 23, 26, 29) und der Negativkontrolle (Test 32) konnte diese Bande nicht nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass dieses Diagnostik-System ausschließlich Phagen, welche aus einer Infektion mit lebenden *P. aeruginosa* Zellen stammen, nachweist. Weiterhin wurden mit den kontaminierten Kosmetikproben (Test 1 - 12) die gleichen Resultate erzielt wie mit dem Standard-Labormedium (Test 13 - 30). Der Phage JG024 infizierte erfolgreich nur lebende *P. aeruginosa* Bakterien und es erfolgte nur der Nachweis der neugebildeten Phagen mittels LFD. Lediglich bei dem Kosmetikprodukt Duschcreme (Fa Joghurt Body Smoothie Granatapfel und Himbeere; Henkel, Düsseldorf, Deutschland) konnten in zwei unabhängigen Durchläufen keine positiven Banden beobachtet werden (Test 5 und 9). Zwischen den verschiedenen Immobilisierungschargen konnten Banden der gleichen Intensität detektiert werden (Test 13, 16, 19, 22, 25, 28). Somit können Schwankungen bezüglich verschiedener Chargen ausgeschlossen werden. In den Proben ohne (Test 15, 18, 21, 24, 27, 30) bzw. mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* Bakterien (Test 14, 17, 20, 23, 26, 29) konnte kein positiver Nachweis und somit keine Zunahme des Phagentiters beobachtet werden.

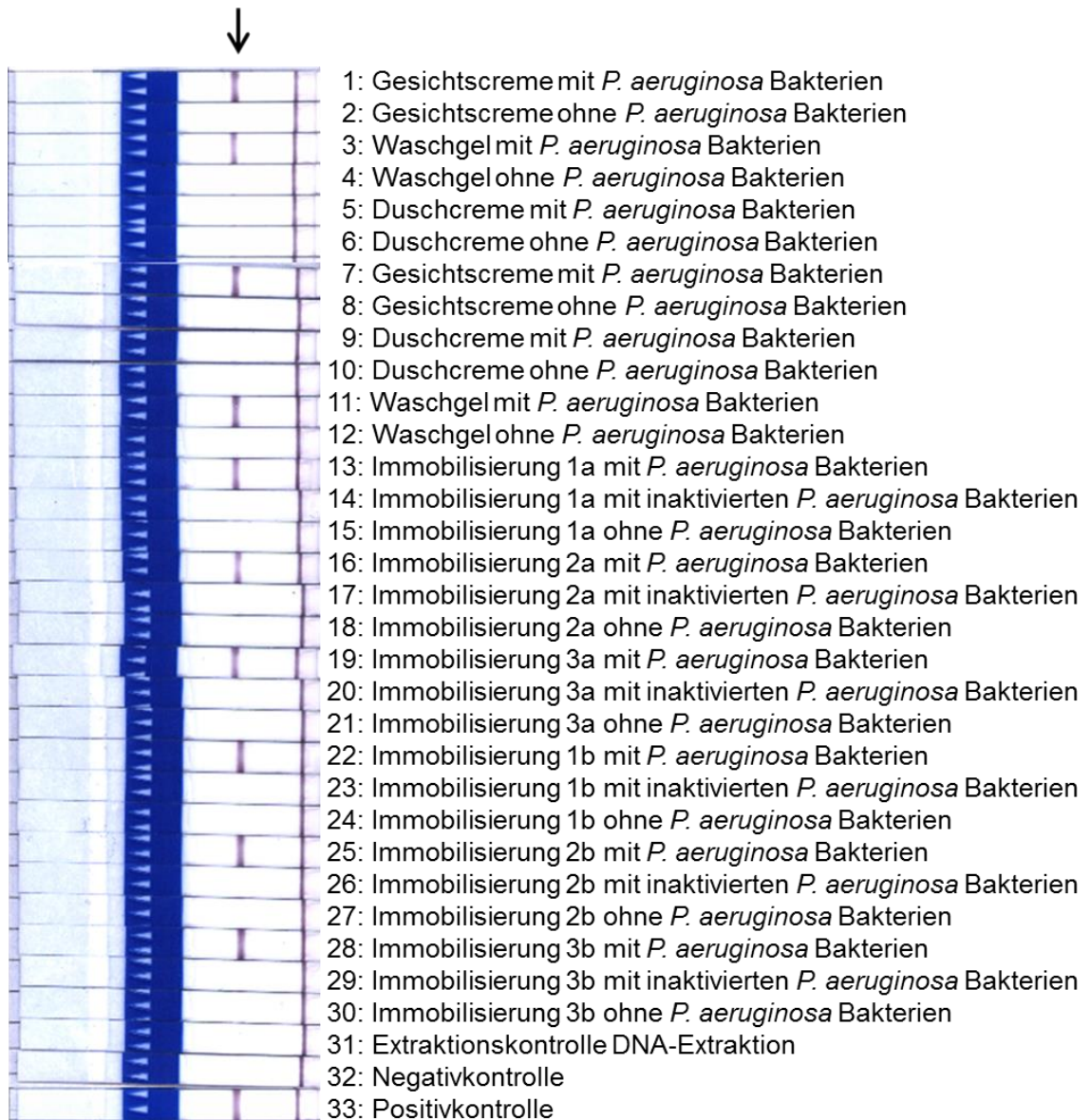


Abbildung 20: Ergebnisse der LFDs nach erfolgter Anwendung des Diagnostik-Systems in mit lebenden, inaktivierten und ohne *P. aeruginosa* Bakterien artifiziell verkeimten Proben.

Die Inkubation der jeweiligen Proben erfolgte mit an Dynabeads® M-280 Streptavidin immobilisierten JG024 Phagen gemäß Kap. 2.2.17. Dargestellt sind die Ergebnisse der LFDs, wobei das Auftreten einer zweiten Bande als positives Ergebnis bewertet wird (mit Pfeil markiert). Getestet wurden verschiedene Kosmetikformulierungen (Test 1 - 12) und drei unabhängige Immobilisierungen in CASO-Bouillon (Test 13 – 30). Die Ergebnisse sind aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Parallel zur Detektion der freigesetzten Phagen mittels LFD erfolgte die klassische Bestimmung des Phagentiters (Kap. 2.2.9) nach der Separierung der freigesetzten Phagen vom Rest der Probe. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 21 dargestellt.

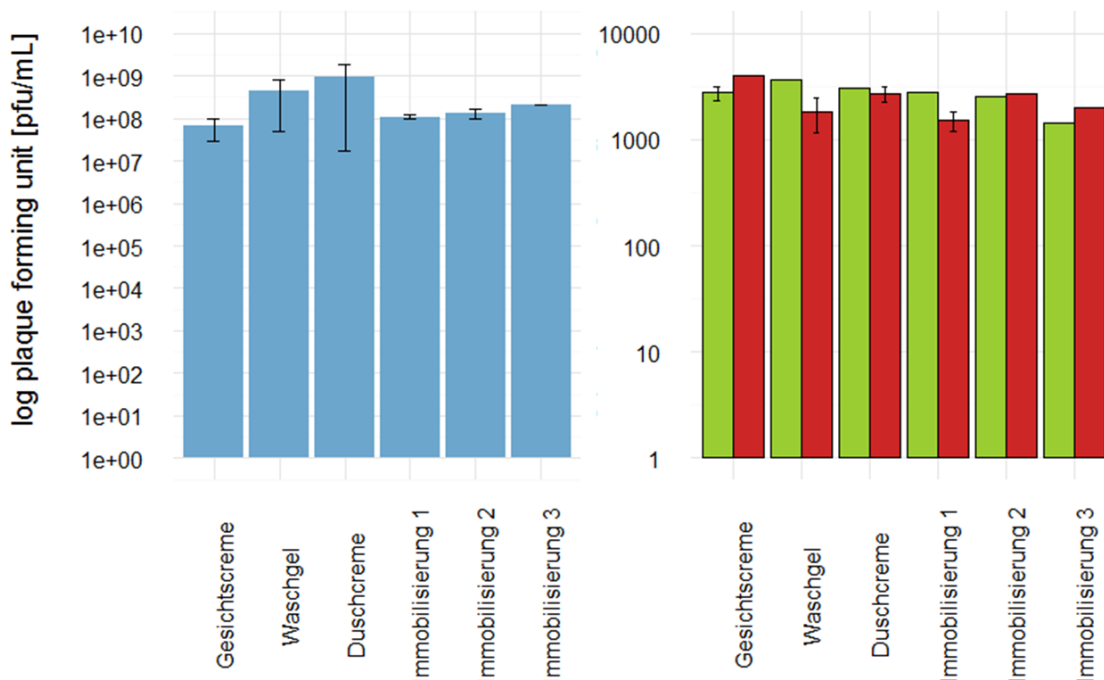


Abbildung 21: Ergebnisse der Phagentiter-Bestimmung nach Separierung der freigesetzten Phagen während des Durchlaufs des Diagnostik-Systems.

Die Inkubation der jeweiligen Proben erfolgte mit an Dynabeads® M-280 Streptavidin immobilisierten JG024 Phagen gemäß Kap. 2.2.17. Dargestellt sind die Ergebnisse der Bestimmung des Phagentiters (Kap. 2.2.9). Es wurden drei verschiedene Kosmetikproben getestet: **Gesichtscreme** (Aok Tagespflege; Henkel, Düsseldorf, Deutschland); **Waschgel** (Aok Bio Expert; Henkel, Düsseldorf, Deutschland); **Duschcreme** (Fa Joghurt Body Smoothie; Henkel, Düsseldorf, Deutschland); sowie drei unabhängige Immobilisierungen in CASO-Bouillon. **Blau**: mit lebenden *P. aeruginosa* Bakterien; **Grün**: ohne *P. aeruginosa* Bakterien; **Rot**: hitzeinaktivierte *P. aeruginosa* Bakterien. Die Ergebnisse sind als Mittelwert +/- Standardfehler aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Darstellung erfolgte mit der Software R (siehe Anhang; R Core Team, 2016).

Dabei konnte eine Zunahme des Phagentiters (ca. $1 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ pfu/mL) in den Proben mit lebenden *P. aeruginosa* Bakterien sowohl in den drei Kosmetikformulierungen als auch den verschiedenen Immobilisierungschargen im Standard-Labormedium beobachtet werden (Abbildung 21 Blau). In den Proben ohne bzw. mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* Bakterien konnte nur ein Phagentiter von ca. 3×10^3 pfu/mL detektiert werden, der auf die Ablösung der Phagen von den Dynabeads® M-280 Streptavidin zurückzuführen ist (Abbildung 21 Grün und Rot). Somit infizierten wie erwartet die immobilisierten JG024 Phagen nur die lebenden *P. aeruginosa* Bakterien. Weiterhin konnten keine Unterschiede bezüglich der Menge an freigesetzten Phagen als auch der abgelösten Phagen zwischen den verschiedenen Immobilisierungschargen beobachtet werden. Demnach können Schwankungen bezüglich

unterschiedlicher Chargen ausgeschlossen werden. In Bezug auf die Kosmetikprobe Duschcreme konnte allerdings ein Titer von 9×10^8 pfu/mL in Anwesenheit lebender *P. aeruginosa* Bakterien bestimmt werden. Mittels LFD hingegen konnte keine positive Bande detektiert werden (vgl. Abbildung 20). Mögliche Gründe könnten in Interaktionen der Reagenzien liegen, so dass nicht genügend DNA isoliert, amplifiziert, hybridisiert oder mittels LFD nachgewiesen werden konnte. Diesbezüglich muss eine weitere Optimierung des Diagnostik-Systems erfolgen. Zusammengefasst konnte die erfolgreiche Detektion der freigesetzten Phagen mittels LFD bestätigt werden sowohl im Standard-Labormedium als auch in realen Anwendungen wie Kosmetikprodukten. Es erfolgte ausschließlich die Detektion der Phagen, die aus einer Infektion von lebenden *P. aeruginosa* Bakterien resultierten und nicht der sich ablösenden Phagen. Die Ergebnisse der verschiedenen Chargen der Immobilisierungen sowie der unabhängig voneinander durchgeführten Experimente zeigten eine sehr gute Qualität durch eine hohe Reproduzierbarkeit und einer konstanten Sensitivität des Diagnostik-Systems. Zur Verifizierung des Diagnostik-Systems wurde eine *P. aeruginosa* Konzentration von ca. 1×10^6 cfu/mL verwendet. Ein Einsatz in z. B. der Kosmetikindustrie setzt jedoch eine geringere Nachweisgrenze von bis zu 10 cfu/mL voraus (DIN EN ISO 22717:2016-05). In ersten Versuchen konnten bereits ca. 1×10^4 cfu/mL nachgewiesen werden, so dass nach ein paar Anpassungen des Diagnostik-Systems auch geringere *P. aeruginosa* Konzentrationen nachweisbar sein sollten. Mit dem entwickelten Diagnostik-System konnten ausschließlich Phagen detektiert werden, die aus Proben mit lebenden *P. aeruginosa* Bakterien resultierten. Somit ist es mit dem in dieser Arbeit entwickelten Diagnostik-System möglich auf einfache Art und Weise zwischen lebenden und toten Bakterienzellen zu unterscheiden. Diese Unterscheidung ist ein wichtiger Faktor, da u.a. nur lebende Pathogene eine Gefahr für den Verbraucher darstellen. Die Bakterien, die während der Produktion, von z. B. Kosmetika, abgetötet werden, deren DNA aber nach Wochen noch nachgewiesen werden kann, stellen keine Bedrohung dar. Somit ist eine eindeutige Unterscheidung zwischen lebenden und toten Bakterien unerlässlich, um beispielsweise unnötige Produktentsorgungen oder Produktionsausfälle zu vermeiden.

4 Zusammenfassung

P. aeruginosa ist ein opportunistisches Humanpathogen, das Infektionen in Atemwegen, Harnwegen und Wunden verursachen kann. Es stellt ein Gesundheitsproblem bei der Produktion von Nahrungsmitteln und Kosmetikprodukten dar. Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Diagnostik-Systems zum Nachweis lebender *P. aeruginosa* Bakterien durch Bakteriophagen. Prinzipiell sollten *P. aeruginosa*-spezifische Bakteriophagen immobilisiert auf Nanopartikeln auf mit *P. aeruginosa* kontaminierten Proben appliziert werden. Die dabei in den *P. aeruginosa* Zellen entstehende Phagen-DNA sollte amplifiziert und nachgewiesen werden. Zuerst konnte gezeigt werden, dass die Phagen JG012, JG054 und JG057 ihren *P. aeruginosa* Wirt über Pili-Strukturen erkennen und eine Vielzahl an *P. aeruginosa*-Isolaten aus CF-Patienten und Harnwegsinfektionen infizieren können. Zudem konnte dsDNA identifiziert und die Phagen JG012 und JG054 der Familie *Siphoviridae* und JG057 der Familie *Podoviridae* zugeordnet werden. Von vier zur Immobilisierung getesteten Nanopartikeln mit verschiedenen Oberflächenfunktionen zeigten die Dynabeads® M-270 Epoxy für den Phagen JG012 und die Dynabeads® M-280 Streptavidin für den Phagen JG024 die besten Ergebnisse. Zudem konnte ein im Vergleich zum freien Phagen unverändertes Infektionsverhalten bestätigt werden. Die Phagen-DNA Präparation und Amplifizierung wurde erfolgreich etabliert. Der Nachweis durch *P. aeruginosa* gebildeter Phagen-DNA gelang mittels *Lateral Flow Dipstick*. Die Verifizierung des neuen Diagnostik-Systems mit drei realen Proben aus der Kosmetikindustrie zeigten eine hohe Sensitivität und Reproduzierbarkeit. Zusammengefasst wurden die kompletten Grundlagen eines Phagen-basierten Nachweises von lebenden *P. aeruginosa*-Zellen in klinischen, aber auch sonstigen kontaminationsgefährdeten Produkten, wie Kosmetika gelegt.

5 Ausblick

In weiterführenden Versuchen könnten Optimierungen am Detektions-System vorgenommen werden. In Bezug auf die beobachteten sich ablösenden Phagen von den Dynabeads, könnten Verbesserungen bezüglich der Immobilisierung vorgenommen werden, um eine Reduzierung bzw. Vermeidung der Ablösung zu erzielen. Dies könnte möglicherweise durch die Verwendung anderer Nanopartikel erzielt werden. Weiterhin wurde in dieser Arbeit zur Verifizierung des Diagnostik-Systems eine *P. aeruginosa* Konzentration von ca. 1×10^6 cfu/mL verwendet. Ein Einsatz in z. B. der Kosmetikindustrie setzt jedoch eine geringere Nachweisgrenze von bis zu 10 cfu/mL voraus. Demnach sollte eine Anpassung des Diagnostik-Systems erfolgen, so dass ebenfalls geringere *P. aeruginosa* Konzentrationen nachweisbar sind und das Diagnostik-System eine kommerzielle Anwendung finden kann. Weiterhin sollten *P. aeruginosa* Phagen mit unterschiedlichen Wirtsspektren im Diagnostik-System eingesetzt werden. Aufgrund der hohen Diversität von *P. aeruginosa* und der Wirtsspezifität der Phagen könnte durch die Anwendung eines Phagencocktails ein großes Spektrum der *P. aeruginosa* Spezies abgedeckt werden, so dass mithilfe dieses einen Tests eindeutige und zuverlässige Ergebnisse erzielt werden können.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Arten der viralen Lebenszyklen (nach Weinbauer, 2004).	11
Abbildung 2: Reaktionsschema der Dynabeads® M-270 Epoxy (Thermo Fisher Scientific).	36
Abbildung 3: Bindungsschema der Dynabeads® M-270 Carboxylic Acid (Thermo Fisher Scientific).	37
Abbildung 4: Prinzip des Diagnostik-Systems.....	48
Abbildung 5: Restriktion der DNA der Phagen JG012, JG054 und JG057 mit dem Enzym <i>AfeI</i>	56
Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Phagen JG012, JG054 und JG057 (von Prof. Dr. M. Rohde, HZI, Braunschweig).	58
Abbildung 7: Sogenannte <i>one-step growth curves</i> der Phagen JG012, JG054 und JG057.	60
Abbildung 8: Restriktion genomischer Phagen-DNA mit der Exonuklease <i>Bal31</i> zur Bestimmung linearer Genome..	65
Abbildung 9: Genomvergleich der Phagen JG012, JG054 und PaMx25 mit progressiveMauve (Darling <i>et al.</i> , 2010).	70
Abbildung 10: Schematische Übersicht des Phagengenoms von JG012.	71
Abbildung 11: Schematische Übersicht des Phagengenoms von JG054.	72
Abbildung 12: Schematische Übersicht des Phagengenoms von JG054.	81
Abbildung 13: Genomvergleich der <i>P. aeruginosa</i> Phagen JG057 und vB_PaeP_Tr60_Ab31 mit progressiveMauve (Darling <i>et al.</i> , 2010).....	84
Abbildung 14: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Dynabeads® M-270 Epoxy mit immobilisierten JG012 Phagen (siehe Pfeil) (von Prof. Dr. Manfred Rohde, HZI, Braunschweig).....	89
Abbildung 15: Infektionsverhalten der freien im Vergleich zu den immobilisierten Phagen an Dynabeads® M-270 Epoxy.....	92
Abbildung 16: Infektionsverhalten der freien und immobilisierten Phagen JG012, JG024 und JG054 (Dynabeads® M-270 Epoxy) im Vergleich zur Kultivierung auf einem porösen Filter.	96

Abbildung 17: Bestimmung der Ablöserate der Phagen JG012 und JG024 von den Dynabeads® M-270 Epoxy, wobei verschiedene Phagen-Konzentrationen immobilisiert wurden.	100
Abbildung 18: Vergleich der Infektiosität und Ablöserate der Phagen JG012 und JG024 von den Dynabeads® M-270 Epoxy und Dynabeads® M-280 Streptavidin.	104
Abbildung 19: Ablauf des etablierten Detektions-Systems zum Nachweis lebender <i>P. aeruginosa</i> -Bakterien mittels Phagen.	108
Abbildung 20: Ergebnisse der LFDs nach erfolgter Anwendung des Diagnostik-Systems in mit lebenden, inaktivierten und ohne <i>P. aeruginosa</i> Bakterien artifiziell verkeimten Proben.	111
Abbildung 21: Ergebnisse der Phagentiter-Bestimmung nach Separierung der freigesetzten Phagen während des Durchlaufs des Diagnostik-Systems.	112

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifizierung von Phagen (nach Ackermann, 2011).....	13
Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte.....	26
Tabelle 3: Auflistung der eingesetzten Chemikalien, Enzyme, Kits und Hilfsmittel.	27
Tabelle 4: Verwendete Phagen.....	28
Tabelle 5: Verwendete <i>P. aeruginosa</i> -Stämme.	29
Tabelle 6: Verwendeter <i>E. coli</i> -Stamm.....	30
Tabelle 7: Verwendete Biotine.	38
Tabelle 8: Zusammensetzung des Ansatzes zur Hydrolyse mit dem Enzym <i>Bal31</i>	42
Tabelle 9: Zusammensetzung der PCR.....	43
Tabelle 10: Programm der Amplifikation.....	43
Tabelle 11: Zusammensetzung der PCR des Phagen-Schnelltests	43
Tabelle 12: Programm der Amplifikation der Phagen-DNA vom Phagen-Schnelltest	43
Tabelle 13: Verwendete Primer	44
Tabelle 14: Zusammensetzung der Hybridisierungsreaktion	44
Tabelle 15: Verwendete Detektionssonde	44
Tabelle 16: Programm der Hybridisierung	44
Tabelle 17: Ligation mit Vektor pJET1.2	45
Tabelle 18: Verwendete Primer zur DNA-Sequenzierung.....	45
Tabelle 19: Übersicht der Ergebnisse der Phagenselektion.	51
Tabelle 20: Überprüfung der Phagen auf eine Infektion von <i>P. aeruginosa</i> und <i>P. aeruginosa</i> Pili-Mutanten (Kap. 3.1.1).	51
Tabelle 21: Wirtsspektrum der Phagen JG012, JG054 und JG057.	53
Tabelle 22: Bestimmung möglicher Rezeptoren von JG012, JG054 und JG057.	55
Tabelle 23: Restriktion der Phagen-DNA mit Restriktionsenzymen.	56
Tabelle 24: Parameter einer Infektion der Phagen JG012, JG054 und JG057.	62
Tabelle 25: Sequenzhomologien der Phagen JG012 und JG054 untereinander und zu bereits publizierten Phagen.....	68

Tabelle 26: Übersicht der CDS mit putativer Funktion der Phagen JG012 und JG054.	73
Tabelle 27: Sequenzen der Phagen JG012 und JG054, die keine Ähnlichkeiten zu dem jeweiligen anderen Phagen haben.	76
Tabelle 28: Nicht-identische Sequenzen des Phagen JG012 zum Phagen PaMx25.	78
Tabelle 29: Sequenzen des Phagen JG054, die keine Ähnlichkeiten zum Phagen PaMx25 zeigen.	79
Tabelle 30: Immobilisierung der Phagen an Dynabeads mit verschiedenen Oberflächenfunktionen.	87
Tabelle 31: Immobilisierung der mittels CsCl-Dichte-Gradienten-Zentrifugation aufgereinigten Phagen an Dynabeads mit verschiedenen Oberflächenfunktionen.	90
Tabelle 32: Test zur Reduzierung unspezifischer Bindungen mit der Gefäßwand.	99
Tabelle 33: Gene des Phagen JG012 mit vorhergesagter Funktion (Kap. 3.1.9.1).	137
Tabelle 34: Gene des Phagen JG054 mit vorhergesagter Funktion (Kap. 3.1.9.1).	141
Tabelle 35: Gene des Phagen JG057 mit vorhergesagter Funktion (Kap. 3.1.9.2).	145

8 Literaturverzeichnis

- Abedon ST (2008) *Bacteriophage Ecology: Population Growth, Evolution and Impact of Bacterial Viruses*, Cambridge University Press.
- Ackermann H-W (2011) Bacteriophage taxonomy. *Microbiol Aust* 90–94.
- Ackermann H-W (2009) Basic Phage Electron Microscopy, in *Bacteriophages: Methods and Protocols. Volume 1: Isolation, Characterization and Interactions* (Clokier MR, and Kropinski AM eds) pp 113–126, Humana Press, New York.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, and Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410.
- Arai H (2011) Regulation and function of versatile aerobic and anaerobic respiratory metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 2:1–13.
- Ashelford KE, Day MJ, Bailey MJ, Lilley AK, and Fry JC (1999) In Situ Population Dynamics of Bacterial Viruses in a Terrestrial Environment. *Appl Environ Microbiol* 65:169–174.
- Ayers M, Sampaleanu LM, Tammam S, Koo J, Harvey H, Howell PL, and Burrows LL (2009) PilM/N/O/P Proteins Form an Inner Membrane Complex That Affects the Stability of the *Pseudomonas aeruginosa* Type IV Pilus Secretin. *J Mol Biol* 394:128–142, Elsevier Ltd.
- Balasubramanian S, Sorokulova IB, Vodyanoy VJ, and Simonian AL (2007) Lytic phage as a specific and selective probe for detection of *Staphylococcus aureus* — A surface plasmon resonance spectroscopic study. *Biosens Bioelectron* 22:948–955.
- Barrow PA, and Soothill JS (1997) Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends Microbiol* 5:268–271.
- Behravan J, Bazzaz BSF, and Malaekheh P (2005) Survey of bacteriological contamination of cosmetic creams in Iran (2000). *Int J Dermatol* 44:482–485.
- Belfort M, and Roberts RJ (1997) Homing endonucleases: Keeping the house in order. *Nucleic Acids Res* 25:3379–3388.
- Bell CE (2005) Structure and mechanism of *Escherichia coli* RecA ATPase. *Mol Microbiol* 58:358–366.
- Bernhardt TG, Wang I-N, Struck DK, and Young R (2001) A Protein Antibiotic in the Phage Q β Virion: Diversity in Lysis Targets. *Science (80-)* 292:2326–2329.
- Birmele M, Ripp S, Jegier P, Roberts MS, Sayler G, and Garland J (2008) Characterization and validation of a bioluminescent bioreporter for the direct detection of *Escherichia coli*. *J M* 75:354–356.
- Black LW (2015) Old, new, and widely true: The bacteriophage T4 DNA packaging mechanism. *Virology* 479–480:650–656.
- Boulanger P (2009) Purification of Bacteriophages and SDS-PAGE Analysis of Phage Structural Proteins from Ghost Particles, in *Bacteriophages: Methods and Protocols. Volume 2: Molecular and Applied Aspects* (Clokier MR, and Kropinski AM eds) pp 228–233, Humana Press, New York.

- Boulos L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J, and Desjardins R (1999) LIVE/DEAD(®) BacLight(TM): Application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods* **37**:77–86.
- Boyd JM (2000) Localization of the histidine kinase PilS to the poles of *Pseudomonas aeruginosa* and identification of a localization domain. *Mol Microbiol* **36**:153–162.
- Boyd JM, and Lory S (1996) Dual function of PilS during transcriptional activation of the *Pseudomonas aeruginosa* pilin subunit gene. *J Bacteriol* **178**:831–839.
- Breeuwer P, and Abee T (2000) Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *Int J Food Microbiol* **55**:193–200.
- Brigati JR, and Petrenko VA (2005) Thermostability of landscape phage probes. *Anal Bioanal Chem* **382**:1346–1350.
- Brussard CPD (2009) Enumeration of Bacteriophages Using Flow Cytometry, in *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization and Interactions* (Clokier MR, and Kropinski AM eds) pp 97–111, Humana Press, New York.
- Brüssow H (2012) What is needed for phage therapy to become a reality in Western medicine? *Virology* **434**:138–142.
- Brüssow H, Canchaya C, and Hardt W (2004) Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**:560–602.
- Brüssow H, and Hendrix RW (2002) Phage Genomics: Small Is Beautiful. *Cell* **108**:13–16.
- Bunthof CJ, Bloemen K, Breeuwer P, Rombouts FM, and Abee T (2001) Flow Cytometric Assessment of Viability of Lactic Acid Bacteria. *Appl Environ Microbiol* **67**:2326–2335.
- Cademartiri R, Anany H, Gross I, Bhayani R, Griffiths M, and Brook MA (2010) Immobilization of bacteriophages on modified silica particles. *Biomaterials* **31**:1904–10.
- Campana R, Scesa C, Patrone V, Vittoria E, and Baffone W (2006) Microbiological study of cosmetic products during their use by consumers: Health risk and efficacy of preservative systems. *Lett Appl Microbiol* **43**:301–306.
- Carlson K (2005) Working with Bacteriophages: Common Techniques and Methodological Approaches, in *Bacteriophages. Biology and Applications* (Kutter E, and Sulakvelidze A eds) pp 437–490, CRC Press, Florida.
- Carver T, Thomson N, Bleasby A, Berriman M, and Parkhill J (2009) DNAPlotter: Circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics* **25**:119–120.
- Casjens SR (2005) Comparative genomics and evolution of the tailed-bacteriophages. *Curr Opin Microbiol* **8**:451–458.
- Catalano CE (2000) The terminase enzyme from bacteriophage lambda: A DNA-packaging machine. *Cell Mol Life Sci* **57**:128–148.
- Cerruti M, Jaworski J, Raorane D, Zueger C, Varadarajan J, Carraro C, Lee S, Maboudian R, and Majumdar A (2009) Polymer-Oligopeptide Composite Coating for Selective Detection of Explosives in Water. *Anal Chem* **81**:4192–4199.

- Chiang P, Sampaleanu LM, Ayers M, Pahuta M, Howell PL, and Burrows LL (2008) Functional role of conserved residues in the characteristics secretion NTPase motifs of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus motor proteins PilB, PilT and PilU. *Microbiology* **154**:114–126.
- Clokier MR, Millard AD, Letarov A V, and Heaphy S (2011) Phages in nature. *Bacteriophage* **1**:31–45.
- Cox CR, Jensen KR, Mondesire RR, and Voorhees KJ (2015) Rapid detection of *Bacillus anthracis* by γ phage amplification and lateral flow immunochromatography. *J Microbiol Methods* **118**:51–56.
- Curtis FA, Reed P, Wilson LA, Bowers LY, Yeo RP, Sanderson JM, Walmsley AR, and Sharples GJ (2011) The C-terminus of the phage λ Orf recombinase is involved in DNA binding. *J Mol Recognit* **24**:333–340.
- D'Herelle F (1917) Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Comptes rendus Acad Sci* 373–375.
- Darling AE, Mau B, and Perna NT (2010) Progressivemaue: Multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS One*, doi: 10.1371/journal.pone.0011147.
- Diaz MR, King JM, and Yahr TL (2011) Intrinsic and extrinsic regulation of type III secretion gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* **2**:1–10.
- DIN EN ISO 22717:2016-05; *Cosmetics-Microbiology-Detection of Pseudomonas aeruginosa (ISO 22717:2015)* (2016).
- Dorst B Van, Mehta J, Bekaert K, Rouah-Martin E, Coen W De, Dubruel P, Blust R, and Robbens J (2010) Recent advances in recognition elements of food and environmental biosensors: A review. *Biosens Bioelectron* **26**:1178–1194, Elsevier B.V.
- Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, and Crow JF (1998) Rates of Spontaneous Mutation. *Genetics* **148**:1667–1686.
- Dube P, Tavares P, Lurz R, and van Heel M (1993) The portal protein of bacteriophage SPP1: a DNA pump with 13-fold symmetry. *EMBO J* **12**:1303–9.
- Edlin G, Lin L, and Kudrna R (1975) Lambda Lysogens of *E. coli* reproduce more rapidly than non-lysogens. *Nature* **255**:735–737.
- Elizaquível P, Aznar R, and Sánchez G (2013) Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. *J Appl Microbiol* **116**:1–13.
- Eschbach M (2004) Molekulare Regulation und Biochemie des anaeroben Langzeitüberlebens von *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertation, Technische Universität Braunschweig.
- Eschbach M, Schreiber K, Trunk K, Buer J, Jahn D, and Schobert M (2004) Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *J Bacteriol* **186**:4596–4604.
- Europäisches Arzneibuch; 8. Ausgabe; Grundwerk 2014 inkl. 1. - 6. Nachtrag (2014) , Deutscher Apotheker Verlag; Govi-Verlag.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), and (EMA) EMA (2009) *The bacterial challenge : time to react*.
- Fastrez J (1996) Phage lysozymes. *EXS* **75**:35–64.
- Fernandes E, Martins VC, Nobrega C, Carvalho CM, Cardoso FA, Cardoso S, Dias J, Deng D, Kluskens LD, Freitas PP, and Azeredo J (2014) A

- bacteriophage detection tool for viability assessment of *Salmonella* cells. *Biosens Bioelectron* **52**:239–246, Elsevier.
- Fittipaldi M, Nocker A, and Codony F (2012) Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *J Microbiol Methods* **91**:276–289, Elsevier B.V.
- Franklin MJ, Nivens DE, Weadge JT, and Lynne Howell P (2011) Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Front Microbiol* **2**:1–16.
- Frimmersdorf E, Horatzek S, Pelnikovich A, Wiehlmann L, and Schomburg D (2010) How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: A metabolomic approach. *Environ Microbiol* **12**:1734–1747.
- Fuhrman JA (1999) Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* **399**:541–548.
- Garbe J (2010) Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* phages and their application for the analysis of lipopolysaccharides, Dissertation, Technische Universität Braunschweig.
- Garbe J, Bunk B, Rohde M, and Schobert M (2011) Sequencing and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* phage JG004. *BMC Microbiol* **11**:102.
- Garbe J, Wesche A, Bunk B, Kazmierczak M, Selezska K, Rohde C, Sikorski J, Rohde M, Jahn D, and Schobert M (2010) Characterization of JG024, a *Pseudomonas aeruginosa* PB1-like broad host range phage under simulated infection conditions. *BMC Microbiol* **10**:301.
- Gervais L, Gel M, Allain B, Tolba M, Brovko L, Zourob M, Mandeville R, Griffiths M, and Evoy S (2007) Immobilization of biotinylated bacteriophages on biosensor surfaces. *Sensors Actuators, B Chem* **125**:615–621.
- Giltner CL, Habash M, and Burrows LL (2010) *Pseudomonas aeruginosa* minor pilins are incorporated into type IV Pili. *J Mol Biol* **398**:444–461, Elsevier Ltd.
- Golkar Z, Bagasra O, and Gene Pace D (2014) Bacteriophage therapy: A potential solution for the antibiotic resistance crisis. *J Infect Dev Ctries* **8**:129–136.
- Goodridge L, Chen J, and Griffiths M (1999a) Development and Characterization of a Fluorescent-Bacteriophage Assay for Detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **65**:1397–1404.
- Goodridge L, Chen J, and Griffiths M (1999b) The use of a fluorescent bacteriophage assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated ground beef and raw milk. *Int J Food Microbiol* **47**:43–50.
- Hatfull GF (2008) Bacteriophage genomics. *Curr Opin Microbiol* **11**:447–453.
- Hirsch EB, and Tam VH (2010) Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res* **10**:1–18.
- Holloway BW, Krishnapillai V, and Morgan a F (1979) Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol Rev* **43**:73–102.
- Huang S, Yang H, Lakshmanan RS, Johnson ML, Wan J, Chen I-H, Wikle III HC, Petrenko VA, Barbaree JM, and Chin BA (2009) Sequential detection of *Salmonella typhimurium* and *Bacillus anthracis* spores using magnetoelastic biosensors. *Biosens Bioelectron* **24**:1730–1736.
- Hyman P, and Abedon ST (2009) Practical Methods for Determining Phage

- Growth, in *Bacteriophages: Methods and Protocols. Volume 1: Isolation, Characterization and Interactions* (Clokier MR, and Kropinski AM eds) pp 175–202, Humana Press, New York.
- Iversen BG, Eriksen H-M, Bø G, Hagestad K, Jacobsen T, Engeset E, Lassen J, and Aavitsland P (2007) *Pseudomonas aeruginosa* contamination of mouth swabs during production causing a major outbreak. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **6**:3.
- Karpenko N (2011) Selektion von Lassa Fieber Virus spezifischen single chain Fv Antikörperfragmenten aus einer Immun- Antikörperbibliothek mittels Phage Display. Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
- Katsura I, and Hendrix RW (1984) Length determination in bacteriophage lambda tails. *Cell* **39**:691–698.
- Kiewitz C, and Tümmler B (2000) Sequence Diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: Impact on Population Structure and Genome Evolution. *J Bacteriol* **182**:3125–3135.
- Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jørgensen A, Molin S, and Tolker-Nielsen T (2003) Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* **48**:1511–1524.
- Klockgether J, Munder A, Neugebauer J, Davenport CF, Stanke F, Larbig KD, Heeb S, Schöck U, Pohl TM, Wiehlmann L, and Tümmler B (2010) Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. *J Bacteriol* **192**:1113–1121.
- Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, Miller CA, Mardis ER, Ding L, and Wilson RK (2012) VarScan 2: Somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res*, doi: 10.1101/gr.129684.111.
- Krüger DH, and Bickle T a (1983) Bacteriophage survival: multiple mechanisms for avoiding the deoxyribonucleic acid restriction systems of their hosts. *Microbiol Rev* **47**:345–360.
- Kulikov EE, Golomidova AK, Letarova MA, Kostyukova ES, Zelenin AS, Prokhorov NS, and Letarov A V. (2014) Genomic sequencing and biological characteristics of a novel *Escherichia coli* bacteriophage 9g, a putative representative of a new *Siphoviridae* genus. *Viruses* **6**:5077–5092.
- Kutter E, Raya R, and Carlson K (2005) Molecular Mechanism of Phage Infection, in *Bacteriophages. Biology and Applications* (Kutter E, and Sulakvelidze A eds) pp 165–222, CRC, Florida.
- Kutter E, and Sulakvelidze A (2005) *Bacteriophages: Biology and Applications*, CRC Press, Florida.
- Kwan T, Liu J, Dubow M, Gros P, and Pelletier J (2006) Comparative genomic analysis of 18 *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. *J Bacteriol* **188**:1184–7.
- Latino L, Essoh C, Blouin Y, Vu Thien H, and Pourcel C (2014) A novel *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophage, Ab31, a Chimera Formed from Temperate Phage PAJU2 and *P. putida* Lytic Phage AF: Characteristics and Mechanism of Bacterial Resistance. *PLoS One*, doi: 10.1371/journal.pone.0093777.
- Lawrence JG, Hatfull GF, Hatfull GF, and Hendrix RW (2002) Imbroglis of Viral Taxonomy: Genetic Exchange and Failings of Phenetic Approaches. *J Bacteriol* **184**:4891–4905.

- Lebedev A a, Krause MH, Isidro AL, Vagin A a, Orlova E V, Turner J, Dodson EJ, Tavares P, and Antson A a (2007) Structural framework for DNA translocation via the viral portal protein. *EMBO J* **26**:1984–94.
- LeBowitz JH, and McMacken R (1984) The bacteriophage λ O and P protein initiators promote the replication of single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res* **12**:3069–3088.
- Li H, and Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, doi: 10.1093/bioinformatics/btp324.
- Liberati NT, Urbach JM, Miyata S, Lee DG, Drenkard E, Wu G, Villanueva J, Wei T, and Ausubel FM (2006) An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:2833–8.
- Liu P V. (1974) Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* **130**:S94–S99.
- Loessner MJ (2005) Bacteriophage endolysins - Current state of research and applications. *Curr Opin Microbiol* **8**:480–487.
- Loessner MJ, Inman RB, Lauer P, and Calendar R (2000) Complete nucleotide sequence, molecular analysis and genome structure of bacteriophage A118 of *Listeria monocytogenes*: Implications for phage evolution. *Mol Microbiol* **35**:324–340.
- Loessner MJ, Rudolf M, and Scherer S (1997) Evaluation of Luciferase Reporter Bacteriophage A511:: luxAB for Detection of *Listeria monocytogenes* in Contaminated Foods †. *Appl Environ Microbiol* **63**:2961–2965.
- Lowe TM, and Eddy SR (1997) tRNAscan-SE: A Program for Improved Detection of Transfer RNA Genes in Genomic Sequence. *Nucleic Acids Res* **25**:955–964.
- Martín AC, López R, and García P (1998) Pneumococcal bacteriophage Cp-1 encodes its own protease essential for phage maturation. *J Virol* **72**:3491–3494.
- Mattick JS (2002) Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* **56**:289–314.
- Merril CR, Scholl D, and Adhya SL (2003) The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nat Rev Drug Discov* **2**:489–97.
- Millard AD (2009) Isolation of Cyanophages from Aquatic Environments, in *Bacteriophages: Methods and Protocols. Volume 1: Isolation, Characterization and Interactions* (Clokier MRJ, and Kropinski AM eds) pp 33–42, Humana Press, New York.
- Molineux IJ (2001) No syringes please, ejection of phage T7 DNA from the virion is enzyme driven. *Mol Microbiol* **40**:1–8.
- Moodley S, Maxwell KL, and Kanelis V (2012) The protein gp74 from the bacteriophage HK97 functions as a HNH endonuclease. *Protein Sci* **21**:809–818.
- Morin NJ, Gong Z, and Li X-F (2004) Reverse transcription-multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio cholerae* O1, and *Salmonella Typhi*. *Clin Chem* **50**:2037–44.
- Mungroo NA, Oliveira G, and Neethirajan S (2015) SERS based point-of-care detection of food-borne pathogens. *Microchim Acta* 697–707.
- Murphy KC (2000) Bacteriophage P22 Abc2 protein binds to RecC increases

- the 5' strand nicking activity of RecBCD and together with lambda bet, promotes Chi-independent recombination. *J Mol Biol* **296**:385–401.
- Nanduri V, Sorokulova IB, Samoylov AM, Simonian AL, Petrenko VA, and Vodyanoy V (2007) Phage as a molecular recognition element in biosensors immobilized by physical adsorption. *Biosens Bioelectron* **22**:986–992.
- Neufeld T, Mittelman AS, Buchner V, and Rishpon J (2005) Electrochemical Phagemid Assay for the Specific Detection of Bacteria Using *Escherichia coli* TG-1 and the M13KO7 Phagemid in a Model System. *Anal Chem* **77**:652–657.
- Neufeld T, Schwartz-Mittelman A, Biran D, Ron EZ, and Rishpon J (2003) Combined Phage Typing and Amperometric Detection of Released Enzymatic Activity for the Specific Identification and Quantification of Bacteria. *Anal Chem* **75**:580–585.
- Newcombe J, Cartwright K, Dyer S, and McFadden J (1998) Naturally occurring insertional Inactivation of the *porA* gene of *Neisseria meningitidis* by integration of IS1301. *Mol Microbiol* **30**:453–457.
- Nocker A, Cheung CY, and Camper AK (2006) Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods* **67**:310–320.
- Nogva HK, Drømtorp SM, Nissen H, and Rudi K (2003) Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques* **34**:804–813.
- Olsen E V, Sorokulova IB, Petrenko VA, Chen I-H, Barbaree JM, and Vodyanoy VJ (2006) Affinity-selected filamentous bacteriophage as a probe for acoustic wave biodetectors of *Salmonella typhimurium*. *Biosens Bioelectron* **21**:1434–1442.
- Ortmann AC, and Suttle CA (2009) Determination of Virus Abundance by Epifluorescence Microscopy, in *Bacteriophages: Methods and Protocols. Volume 1: Isolation, Characterization and Interactions* (Clokier MR, and Kropinski AM eds) pp 87–95, Humana Press, New York.
- Pajunen M, Kiljunen S, and Skurnik M (2000) Bacteriophage phiYeO3-12, specific for *Yersinia enterocolitica* serotype O:3, is related to coliphages T3 and T7. *J Bacteriol* **182**:5114–20.
- Pan T, and Uhlenbeck OC (1993) Circularly permuted DNA, RNA and proteins - a review. *Gene* **125**:111–114.
- Pell LG, Kanelis V, Donaldson LW, Howell PL, and Davidson AR (2009) The phage lambda major tail protein structure reveals a common evolution for long-tailed phages and the type VI bacterial secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:4160–4165.
- Pell LG, Liu A, Edmonds L, Donaldson LW, Howell PL, and Davidson AR (2009) The X-Ray Crystal Structure of the Phage λ Tail Terminator Protein Reveals the Biologically Relevant Hexameric Ring Structure and Demonstrates a Conserved Mechanism of Tail Termination among Diverse Long-Tailed Phages. *J Mol Biol* **389**:938–951, Elsevier Ltd.
- Penadés JR, Donderis J, García-Caballer M, Tormo-Más MÁ, and Marina A (2013) DUTPases, the unexplored family of signalling molecules. *Curr Opin Microbiol* **16**:163–170.

- Pickard DJJ (2009) Preparation of Bacteriophage Lysates and Pure DNA, in *Bacteriophages: Methods and Protocols. Volume 2: Molecular and Applied Aspects* (Clokier MRJ, and Kropinski AM eds) pp 3–10, Humana Press, New York.
- Pirnay J-P, Verbeken G, Rose T, Jennes S, Zizi M, Huys I, Lavigne R, Merabishvili M, Vaneechoutte M, Buckling A, and De Vos D (2012) Introducing yesterday's phage therapy in today's medicine. *Future Virol* **7**:379–390.
- Rabsch W, Helm RA, and Eisenstark A (2004) Diversity of Phage Types among Archived Cultures of the Demerec Collection of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* Strains. *Appl Environ Microbiol* **70**:664–669.
- R Core Team (2016) R: A language and environment for statistical computing., R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Ragheb SM, Yassin AS, and Amin M a (2012) The application of uniplex, duplex, and multiplex PCR for the absence of specified microorganism testing of pharmaceutical excipients and drug products. *PDA J Pharm Sci Technol* **66**:307–17.
- Rahme L, Stevens E, Wolfort S, Shao J, Tompkins R, and Ausubel F (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* (80-) **268**:1899–1902, American Association for the Advancement of Science.
- Rakhuba D V, Kolomiets EI, Dey ES, and Novik GI (2010) Bacteriophage Receptors , Mechanisms of Phage Adsorption and Penetration into Host Cell. *Polish J Microbiol* **59**:145–155.
- Ripp S, Jegier P, Johnson CM, Brigati JR, and Sayler GS (2008) Bacteriophage-amplified bioluminescent sensing of *Escherichia coli* O157 : H7. *Anal Bioanal Chem* **391**:507–514.
- Ripp S, and Miller R V (1997) The role of pseudolysogeny in bacteriophage-host interactions in a natural freshwater environment. *Microbiology* **143**:2065–2070.
- Rohwer F, and Barott K (2013) Viral information. *Biol Philos* **28**:283–297.
- Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream M a, and Barrell B (2000) Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* **16**:944–945.
- Sabri M, Häuser R, Ouellette M, Liu J, Dehbi M, Moeck G, García E, Titz B, Uetz P, and Moineau S (2011) Genome annotation and intraviral interactome for the *Streptococcus pneumoniae* virulent phage Dp-1. *J Bacteriol* **193**:551–562.
- Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, and Prince AS (2005) Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* **171**:1209–1223.
- Saiyed ZM, Telang SD, and Ramchand CN (2003) Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine. *Biomagn Res Technol* **1**:1–8.
- Salunkhe P, Salunkhe P, To T, To T, Buer J, Buer J, Tu B, and Tu B (2005) Genome-Wide Transcriptional Profiling of the Steady-State Response of. *Society* **187**:2565–2572.
- Sanders MF (1999) Method for identifying target bacteria. US Patent No. 5,888,725

- Schuch R, Nelson D, and Fischetti VA (2002) A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature* **418**:440–445.
- Seemann T (2014) Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, doi: 10.1093/bioinformatics/btu153.
- Sepúlveda-Robles O, Kameyama L, and Guarneros G (2012) High diversity and novel species of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. *Appl Environ Microbiol* **78**:4510–4515.
- Shabani A, Marquette CA, Mandeville R, and Lawrence MF (2013) Magnetically-assisted impedimetric detection of bacteria using phage-modified carbon microarrays. *Talanta* **116**:1047–1053, Elsevier.
- Shabbir MAB, Hao H, Shabbir MZ, Wu Q, Sattar A, and Yuan Z (2016) Bacteria vs. Bacteriophages: Parallel Evolution of Immune Arsenals. *Front Microbiol* **7**:1–8.
- Shao Y, and Wang IN (2008) Bacteriophage adsorption rate and optimal lysis time. *Genetics* **180**:471–482.
- Sharma A, Krause A, and Worgall S (2011) Recent developments for *Pseudomonas* vaccines. *Hum Vaccin* **7**:999–1011.
- Shin DH, Choi YS, and Cho YH (2008) Unusual properties of catalase A (KatA) of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 are associated with its biofilm peroxide resistance. *J Bacteriol* **190**:2663–2670.
- Singh A, Glass N, Tolba M, Brovko L, Griffiths M, and Evoy S (2009) Immobilization of bacteriophages on gold surfaces for the specific capture of pathogens. *Biosens Bioelectron* **24**:3645–3651.
- Sintchak MD, Arjara G, Kellogg BA, Stubbe J, and Drennan CL (2002) The crystal structure of class II ribonucleotide reductase reveals how an allosterically regulated monomer mimics a dimer. *Nat Struct Biol* **9**:293–300.
- Smartt AE, and Ripp S (2011) Bacteriophage reporter technology for sensing and detecting microbial targets. *Anal Bioanal Chem* **400**:991–1007.
- Smietana M, Bock WJ, Mikulic P, Ng A, Chinnappan R, and Zourob M (2011) Detection of bacteria using bacteriophages as recognition elements immobilized on long-period fiber gratings. *Opt Express* **19**:7971–7978.
- Spiers AJ, Buckling A, and Rainey PB (2000) The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* **146**:2345–2350.
- Stoddard BL (2005) Homing endonuclease structure and function. *Q Rev Biophys* **38**:49–95.
- Stubbe J (1993) Cloning , sequencing , and expression of the adenosylcobalamin- dependent ribonucleotide reductase from *Lactobacillus leichmannii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:8352–8356.
- Summer EJ, Gonzalez CF, Bomer M, Carlile T, Embry A, Kucherka AM, Lee J, Mebane L, Morrison WC, Mark L, King MD, LiPuma JJ, Vidaver AK, and Young R (2006) Divergence and mosaicism among virulent soil phages of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Bacteriol* **188**:255–268.
- Summers WC (2001) Bacteriophage Therapy. *Annu Rev Microbiol* **55**:437–51.
- Tan ASB, Tüysüz M, and Ötük G (2013) Investigation of preservative efficacy and microbiological content of some cosmetics found on the market. *Pak J Pharm Sci* **26**:153–157.
- Tidona C, and Darai G (2011) *The Springer Index of Viruses*, 2. (Tidona C, and Darai G eds), Springer Sciences & Business, New York.

- Twort FW (1915) An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Lancet* 1241–1243.
- Venkatesh J, Kumar P, Krishna PSM, Manjunath R, and Varshney U (2003) Importance of Uracil DNA Glycosylase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Mycobacterium smegmatis*, G+C-rich Bacteria, in Mutation Prevention, Tolerance to Acidified Nitrite, and Endurance in Mouse Macrophages. *J Biol Chem* **278**:24350–24358.
- Verma V, Harjai K, and Chhibber S (2009) Characterization of a T7-Like Lytic Bacteriophage of *Klebsiella pneumoniae* B5055 : A Potential Therapeutic Agent. *Curr Microbiol* **59**:274–281.
- Waldor MK, and Mekalanos JJ (1996) Lysogenic Conversion by a Filamentous Phage Encoding Cholera Toxin. *Science* (80-) **272**:1910–1914.
- Wang IN (2006) Lysis timing and bacteriophage fitness. *Genetics* **172**:17–26.
- Warner HR, Thompson RB, Mozer TJ, and Duncan BK (1979) The properties of a bacteriophage T5 mutant unable to induce deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase. Synthesis of uracil-containing T5 deoxyribonucleic acid. *J Biol Chem* **254**:7534–7539.
- Weinbauer MG (2004) Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev* **28**:127–181.
- Weinbauer MG, and Rassoulzadegan F (2004) Minireview Are viruses driving microbial diversification and diversity ? *Environ Microbiol* **6**:1–11.
- Weiß N, Wente W, and Müller P (2010) *Eppendorf LoBind: Bewertung der Proteinrückgewinnung in Eppendorf Protein LoBind Tubes und Plates.*
- Whitman WB, Coleman DC, and Wiebe WJ (1998) Perspective Prokaryotes : The unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:6578–6583.
- Wiehlmann L, Wagner G, Cramer N, Siebert B, Gudowius P, Morales G, Köhler T, van Delden C, Weinl C, Slickers P, and Tümmler B (2007) Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:8101–6.
- Zumft WG (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**:533–616.

Danksagung

Prof. Dr. Dieter Jahn danke ich für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit in seinem Arbeitskreis anfertigen zu können und für die Übernahme des Gutachtens.

Prof. Dr. Karsten Hiller danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

PD Dr. Max Schobert danke ich sehr herzlich für die Bereitstellung dieses spannenden Themas und der hervorragenden Betreuung. Ohne seine Motivation, Kreativität und vor allem seinem Optimismus ☺ wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung danke ich für die Förderung des Forschungsvorhabens dieser Arbeit.

Dr. Nina Diekmann, Dr. Sabine Peters und Ulrich Krause möchte ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit an diesem Projekt bedanken. Für die Hilfsbereitschaft und projektfördernden Gespräche.

Weiterhin danke ich Maren Behringer, Steffi Heyber, Matze Ebert, Dr. Rebekka Biedendieck,... für die tolle Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft sowohl im fachlichen als auch zwischenmenschlichen Bereich. Natürlich danke ich auch allen anderen Mitgliedern der AK Jahn und AG Steinert für die nette Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre. Ich bedanke mich bei den StudentInnen, die ihre Bachelorarbeit und Praktika im Rahmen meiner Doktorarbeit angefertigt haben und zu dieser Arbeit mit beigetragen haben.

Ein riesengroßes Dankeschön geht an Dr. Ann-Kathrin Meyer für die großartige Zeit innerhalb und außerhalb des Labors. ☺

Dr. Boyke Bunk danke ich für die unermüdliche Unterstützung bei den bioinformatischen Auswertungen meiner Arbeit.

Zuletzt geht ein ganz besonderer Dank an meine Familie, meinem Freund und meinen Freunden, die mich während des Studiums und meiner Promotion unterstützt haben und immer an mich geglaubt haben.

Anhang

R-Skripte für die Erstellung der Graphen

Die folgenden Skripte wurden für die Erstellung der graphischen Darstellungen der Wachstumsexperimente der Phagen verwendet und entsprechend angepasst.

```
#####
##allgemeines R Skript zur Darstellung von Wachstumsexperimenten,
Einzelbestimmung#####
#####
```

```
##Daten im csv Format laden##Bsp.: one.step.growth.curve.csv ##
#alle Daten für eine Abbildung in einer Datei abspeichern
library(plotrix)          ##zum plotten der Daten
library(sfsmisc)          ##zur logarithmischen Darstellung der Achsen
##Erstellung von einzelnen Datensätzen, die jeweils geplottet werden sollen##Bsp.: JG012,
JG054;...
Kurve1<-subset(one.step.growth.curve, type %in% c("JG012"))
Kurve2<-subset(one.step.growth.curve, type %in% c("JG054"))

plot(one.step.growth.curve$Daten x-Achse, one.step.growth.curve$Daten y-Achse, type="n",
      xlab="x-Achsenbeschriftung", ylab="y-Achsenbeschriftung", log="y",
      yaxt="n", ylim=c(Grenzwerte y-Achse))
sfsmisc::eaxis(side=2, at=10^c(Werte die an der y-Achse abgebildet werden soll))
lines(Kurve1$Daten x-Achse, Kurve1$Daten y-Achse, col="black", type="o", pch=16, lty=1)
lines(Kurve2$Daten x-Achse, Kurve2$Daten y-Achse, col="red", type="o", pch=17, lty=2)
```

```
#####Bsp. One-step growth curve der Phagen JG012, JG054, JG057#####
```

```
#Datensatz laden: one.step.JG012.JG054.JG057.csv
#Erstellung einzelner Datensätze
JG012<-subset (one.step.JG012.JG054.JG057, type %in% c("JG012"))
JG054<-subset (one.step.JG012.JG054.JG057, type %in% c("JG054"))
JG057<-subset (one.step.JG012.JG054.JG057, type %in% c("JG057"))
```

```
#Daten plotten
plot(one.step.JG012.JG054.JG057$time, one.step.JG012.JG054.JG057$pfu.mL, type="n",
      xlab = "Zeit [min]", ylab = "log plaque forming unit [pfu/mL]", log = "y",
      yaxt="n", ylim = c(100000,100000000))
```

```

sfsmisc::eaxis(side=2, at=10^c(5,6,7,8))
lines(JG012$time, JG012$pfu.mL, col="black", type="o", pch=16, lty=1)
lines(JG054$time, JG054$pfu.mL, col="green", type = "o", pch=17, lty=1)
lines(JG057$time, JG057$pfu.mL, col="red", type="o", pch=15, lty=1)

#####
##allgemeines R Skript zur Darstellung von Wachstumsexperimenten, Mehrfachbestimmung#####
#####

##Daten im csv Format laden##Bsp.: one.step.growth.curve.csv ##
#alle Daten für eine Abbildung in einer Datei abspeichern
library(plotrix)          ##zum plotten der Daten
library(Hmisc)
library(sfsmisc)          ##zur logarithmischen Darstellung der Achsen
##Erstellung von einzelnen Datensätzen, die jeweils geplottet werden sollen##Bsp.: JG012, JG054;...
Kurve1<-subset(one.step.growth.curve, type %in% c("JG012"))
Kurve2<-subset(one.step.growth.curve, type %in% c("JG054"))

#mean bilden und Standardfehler (std) und zu einer Datei zusammenfügen
meanKurve1<-aggregate(list(mittelwert=Kurve1$pfu.mL), list(time=Kurve1$time), mean, na.rm=T)
stdKurve1<-aggregate(list(se=Kurve1$pfu.mL), list(time=Kurve1$time), std.error, na.rm=T)
Kurve1.2<-merge(meanKurve1, stdKurve1)

meanKurve2<-aggregate(list(mittelwert=Kurve2$pfu.mL), list(time=Kurve2$time), mean, na.rm=T)
stdKurve2<-aggregate(list(se=Kurve2$pfu.mL), list(time=Kurve2$time), std.error, na.rm=T)
Kurve2.2<-merge(meanKurve2, stdKurve2)

#Daten plotten
plot(one.step.growth.curve$Daten x-Achse, one.step.growth.curve$Daten y-Achse, type="n",
      xlab = "x-Achsenbeschriftung", ylab = "y-Achsenbeschriftung", log = "y", yaxt="n", ylim = c(Grenzwerte y-Achse))
sfsmisc::eaxis(side = 2, at=10^c(Werte die an der y-Achse abgebildet werden sollen))
with(data=Kurve1.2,expr=Hmisc::errbar(time, mittelwert, mittelwert+se, mittelwert-se, add=T))
lines(Kurve1.2$Daten x-Achse, Kurve1.2$mittelwert, col="black", pch=16, lty=1)

```

```

points(one.step.growth.curve$Daten x-Achse, one.step.growth.curve$Daten y-Achse, type="n")
with(data=Kurve2.2,expr = hmisc::errbar(time, mittelwert, mittelwert+se, mittelwert-se, add=T,
                                     errbar.col="green3", col="green3", pch = 17, lty = 1))
lines(Kurve2.2$Daten x-Achse, Kurve2.2$mittelwert, col="green3", pch=17, lty=1)

```

##Bsp. JG012 Dynabeads® M-270 Epoxy: frei vs. immobilisiert, Dreifachbestimmung##

```
#Datensatz laden: JG012.frei.vs.im.csv
```

```
library(plotrix)
```

```
library(Hmisc)
```

```
library(sfsmisc)
```

```
#Erstellung einzelner Datensätze
```

```
JG012frei<-subset(JG012.frei.vs.im, type %in% c("JG012 frei"))
```

```
JG012im<-subset(JG012.frei.vs.im, type %in% c("JG012 im"))
```

```
#mean bilden und Standardfehler (std) und zu einer Datei zusammenfügen
```

```
meanJG012frei<-aggregate(list(mittelwert=JG012frei$pfu.mL), list(time=JG012frei$time),mean)
```

```
stdJG012frei<-aggregate(list(se=JG012frei$pfu.mL), list(time=JG012frei$time),std.error)
```

```
JG012frei2<-merge(meanJG012frei, stdJG012frei)
```

```
meanJG012im<-aggregate(list(mittelwert=JG012im$pfu.mL), list(time=JG012im$time), mean,
na.rm=T)
```

```
stdJG012im<-aggregate(list(se=JG012im$pfu.mL), list(time=JG012im$time), std.error, na.rm=T)
```

```
JG012im2<-merge(meanJG012im, stdJG012im)
```

```
#Daten plotten
```

```
plot(JG012.frei.vs.im$time, JG012.frei.vs.im$pfu.mL, type="n",
```

```
      xlab = "Zeit [min]", ylab = "log plaque forming unit [pfu/mL]", log = "y", yaxt="n", ylim =
c(10000, 100000000))
```

```
sfsmisc::eaxis(side = 2, at=10^c(4,5,6,7,8))
```

```
with(data=JG012frei2,expr=Hmisc::errbar(time, mittelwert, mittelwert+se, mittelwert-se, add=T))
```

```
lines(JG012frei2$time, JG012frei2$mittelwert, col="black", pch=16, lty=1)
```

```
points(JG012.frei.vs.im$time, JG012.frei.vs.im$pfu.mL, type="n")
```

```
with(data=JG012im2,expr = hmisc::errbar(time, mittelwert, mittelwert+se, mittelwert-se, add=T,
                                     errbar.col="green3", col="green3", pch = 17, lty = 1))
```

```
lines(JG012im2$time, JG012im2$mittelwert, col="green3", pch=17, lty=1)
```

```
#####  
####allgemeines R Skript zur Darstellung von Werten im barplot,  
Mehrfachbestimmung#####  
#####  
  
##Daten im csv Format laden##Bsp. Ablöserate.Dynabeads.Epoxy.Streptavidin.csv##  
# alle Daten für eine Abbildung in einer Datei abspeichern  
library(sfsmisc)  
library(ggplot2)  
library(gplots)  
  
##Erstellung von einzelnen Datensätzen, die jeweils geplottet werden sollen##Bsp.: Epoxy,  
Streptavidin  
Balken1<-subset(Ablöserate.Dynabeads.Epoxy.Streptavidin, type%in% c("Epoxy"))  
Balken2<-subset(Ablöserate.Dynabeads.Epoxy.Streptavidin, type%in% c("Streptavidin"))  
  
#mean bilden und Standardfehler (std) und zu einer Datei zusammenfügen  
meanBalken1<-aggregate(list(mittelwert=Balken1$pfu,mL), list(condition=Balken1$condition),  
mean, na.rm=T)  
stdBalken1<-aggregate(list(se=Balken1$pfu.mL), list(condition=Balken1$condition), std.error,  
na.rm=T)  
Balken1.2<-merge(meanBalken1, stdBalken1)  
#Spalte einfügen  
Balken1.3<-cbind(Balken1.2, type="Epoxy")  
  
meanBalken2<-aggregate(list(mittelwert=Balken2$pfu,mL), list(condition=Balken2$condition),  
mean, na.rm=T)  
stdBalken2<-aggregate(list(se=Balken2$pfu.mL), list(condition=Balken2$condition), std.error,  
na.rm=T)  
Balken2.2<-merge(meanBalken2, stdBalken2)  
Balken2.3<-cbind(Balken2.2, type="Streptavidin")  
  
#zu einem Datensatz zusammenfügen  
Balken1und2<-rbind(Balken1.3, data.frame(Balken2.3))  
  
#2 Datensätze plotten als gruppiertes Balkendiagramm  
p<-ggplot(data=Balken1und2, aes(x=condition, y=mittelwert, fill=type), yaxt="n")+  
  geom_bar(stat = "identity",color="black", position=position_dodge())+  
  geom_errorbar(aes(ymin=mittelwert-se, ymax=mittelwert+se), width=.2,
```

```

position=position_dodge(.9))+theme_minimal()
p+scale_fill_manual(values=c("green3", "red3"))+theme_minimal()
p+labs(x="x-Achsenbeschriftung", y="y-Achsenbeschriftung")+
  scale_fill_manual(values=c("yellowgreen",
"firebrick3"))+theme_minimal()+scale_y_log10(limits=c(niedrigster und höchster
Wert),breaks=c(Diskrete Werte die dargestellt werden sollen))

```

#1 Datensatz plotten als Balkendiagramm

```

p<-ggplot(data=Balken2.2, aes(x=condition, y=mittelwert, fill=type), yaxt="n")+
  geom_bar(stat="identity", position=position_dodge())+
  geom_errorbar(aes(ymin=mittelwert-se, ymax=mittelwert+se), width=.2,
    position=position_dodge(.9))+theme_minimal()
p+labs(x="x-Achsenbeschriftung", y="y-Achsenbeschriftung")+
  scale_fill_manual(values = c("skyblue3"))+theme_minimal()+scale_y_log10(limits=c(niedrigster
und höchster Wert), breaks=c(Diskrete Werte die dargestellt werden sollen))

```

##Bsp. Durchlauf Diagnostik-System (Abbildung 21).##

##Daten laden: LFD.Plaqueassay.csv##

##einzelne Datensätze erstellen

```

lebens<-subset(LFD.Plaqueassay, type%in%c("mit PAO1"))
tot<-subset(LFD.Plaqueassay, type %in% c("tote PAO1"))
ohne<-subset(LFD.Plaqueassay, type %in% c("ohne PAO1"))

```

#mean bilden und Standardfehler (std) und zu einer Datei zusammenfügen

```

meanlebens<-aggregate(list(mittelwert=lebens$pfu.mL), list(condition=lebens$condition),
mean, na.rm=T)
stdlebens<-aggregate(list(se=lebens$pfu.mL), list(condition=lebens$condition), std.error,
na.rm=T)
lebens2<-merge(meanlebens, stdlebens)
lebens22<-cbind(lebens2, type="lebens")

```

```

meantot<-aggregate(list(mittelwert=tot$pfu.mL), list(condition=tot$condition), mean, na.rm=T )
stdtot<-aggregate(list(se=tot$pfu.mL), list(condition=tot$condition), std.error, na.rm=T)
tot2<-merge(meantot, stdtot)
tot22<-cbind(tot2, type="tot")

```

```

meanohne<-aggregate(list(mittelwert=ohne$pfu.mL), list(condition=ohne$condition), mean,
na.rm=T)
stdohne<-aggregate(list(se=ohne$pfu.mL), list(condition=ohne$condition), std.error, na.rm=T)

```

```
ohne2<-merge(meanohne, stdohne)
ohne22<-cbind(ohne2, type="ohne")
```

```
####ein Datensatz: ohne und tot
ohnetot<-rbind(ohne22, data.frame(tot22))
```

```
#####2 Datensätze plotten als gruppiertes Balkendiagramm
```

```
p<-ggplot(data=ohnetot, aes(x=condition, y=mittelwert, fill=type), yaxt="n")+
  geom_bar(stat = "identity",color="black", position=position_dodge())+
  geom_errorbar(aes(ymin=mittelwert-se, ymax=mittelwert+se), width=.2,
    position=position_dodge(.9))+theme_minimal()
p+scale_fill_manual(values=c("green3", "red3"))+theme_minimal()
p+labs(x="", y="log plaque forming unit [pfu/mL]")+
  scale_fill_manual(values=c("yellowgreen",
"firebrick3"))+theme_minimal()+scale_y_log10(limits=c(1,10000),breaks=c(1,10,100,1000,1000
0))
```

```
#####1Datensatz plotten
```

```
p<-ggplot(data=lebens22, aes(x=condition, y=mittelwert, fill=type), yaxt="n")+
  geom_bar(stat="identity", position=position_dodge())+
  geom_errorbar(aes(ymin=mittelwert-se, ymax=mittelwert+se), width=.2,
    position=position_dodge(.9))+theme_minimal()
p+labs(x="", y="log plaque forming unit [pfu/mL]")+
  scale_fill_manual(values=
c("skyblue3"))+theme_minimal()+scale_y_log10(limits=c(1,100000000000),
breaks=c(1,10,100,1000,10000,100000,1000000,10000000,100000000,1000000000,1000000000
000))
```


Tabelle 33: Gene des Phagen JG012 mit vorhergesagter Funktion (Kap. 3.1.9.1).

Dargestellt sind die Gene mit der Sequenz, vorhergesagter Funktion und die mittels BLASTP ermittelten signifikanten Treffer (Altschul et al., 1990). (-) keine signifikanten Treffer.

Gen	Nukleotidposition	vorhergesagte Funktion	Homologie	Max score	Total score	Ähnlichkeits-score	E-value	Identität
<i>terS</i>	1-447	putative terminase small subunit	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	297	297	100%	2,0E-102	100%
<i>terL</i>	444-1766	putative terminase large subunit	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	913	913	100%	0,0E+00	99%
3	1779-3335	portal protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	1023	1023	99%	0,0E+00	98%
4	3339-4538	putative head protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	799	799	100%	0,0E+00	97%
5	4597-5412	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	534	534	100%	0,0E+00	97%
6	5562-6596	major head protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	692	692	100%	0,0E+00	98%
7	6662-7171	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	320	320	100%	2,0E-110	97%
8	7245-7952	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	353	353	100%	2,0E-121	89%
9	7956-8288	structural protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	203	203	100%	3,0E-66	96%
10	8288-8800	structural protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	334	334	100%	4,0E-116	97%
11	8804-9187	structural protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	237	237	100%	5,0E-79	92%
12	9184-9594	tail terminator protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	273	273	100%	4,0E-93	99%
13	9599-11128	major tail structural protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	1003	1003	100%	0,0E+00	97%
14	11187-11606	putative structural protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	283	283	100%	7,0E-97	99%
15	11744-11962	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	149	149	100%	5,0E-46	99%
16	11963-12391	structural protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	279	279	100%	4,0E-95	98%
17	12391-15321	tail tape measure protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	1925	1925	100%	0,0E+00	98%
18	15332-16852	structural protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	548	548	100%	0,0E+00	53%
19	16862-17865	structural protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	438	438	99%	5,0E-152	64%
20	17865-19046	structural protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	578	578	98%	0,0E+00	73%
21	19048-19557	structural protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	295	295	100%	3,0E-95	79%
22	19554-20363	structural protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	509	509	100%	0,0E+00	93%
23	20373-20504	structural protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	85,5	85,5	100%	5,0E-21	98%

Gen	Nukleotidposition	vorhergesagte Funktion	Homologie	Max score	Total score	Ähnlichkeits-score	E-value	Identität
24	20604-20807	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	117	117	88%	1,0E-33	97%
25	20794-22971	structural protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	1351	1351	98%	0,0E+00	92%
26	22971-23327	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage AAT-1</i>	200	200	100%	1,0E-64	80%
27	23340-23705	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	249	249	100%	6,0E-84	98%
28	23677-23883	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	144	144	100%	3,0E-44	100%
28	23683-23706	hypothetical protein	-					
29	23946-24224	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	190	190	100%	1,0E-61	99%
<i>polB</i>	24411-26591	putative DNA polymerase B	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	1497	1497	99%	0,0E+00	99%
31	26643-27596	DNA polymerase III β subunit	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	663	663	100%	0,0E+00	100%
32	27596-28534	queuosine tRNA ribosyltransferase	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	656	656	100%	0,0E+00	99%
33	28531-28974	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	302	302	99%	4,0E-104	99%
<i>folE</i>	29033-29926	GTP cyclohydrolase	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	397	397	64%	2,0E-138	99%
<i>queD</i>	29936-30358	queuosine biosynthesis protein QueD	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	293	293	100%	6,0E-101	99%
<i>queC</i>	30363-31763	queuosine biosynthesis protein QueC	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	960	960	100%	0,0E+00	98%
<i>queE</i>	31767-32474	queuosine biosynthesis protein QueE	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	480	480	100%	8,0E-172	98%
38	32565-33089	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	323	323	100%	9,0E-112	98%
39	33186-33857	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	448	448	100%	1,0E-159	96%
40	33847-34020	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	114	114	100%	2,0E-32	96%
41	34061-34591	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	345	345	100%	5,0E-120	97%
42	34739-36514	superfamily II DNA helicase	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	1237	1237	100%	0,0E+00	100%
<i>recB</i>	36511-37443	exonuclease RecB	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	645	645	100%	0,0E+00	99%
44	37471-37662	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	127	127	100%	9,0E-38	100%

Gen	Nukleotidposition	vorhergesagte Funktion	Homologie	Max score	Total score	Ähnlichkeits-score	E-value	Identität
45	37725-38588	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	345	345	56%	2,0E-118	100%
<i>recA</i>	38594-39319	RecA ATPase	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	494	494	100%	5,0E-177	100%
47	39319-40209	DNA topoisomerase	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	610	610	100%	0,0E+00	100%
48	40206-40361	hypothetical protein	<i>Escherichia phage ECML-117</i>	41,6	41,6	68%	0,0E+00	51%
49	40358-41260	DNA ligase	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	611	611	100%	0,0E+00	99%
<i>thyX</i>	41262-42002	thymidylate synthase	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	508	508	100%	0,0E+00	98%
<i>maseH</i>	41999-42358	RNaseH	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	239	239	100%	8,0E-80	98%
52	42444-42896	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	313	313	100%	1,0E-108	100%
<i>dut</i>	42905-43387	deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	<i>Escherichia phage Seurat</i>	183	183	98%	2,0E-56	58%
54	43481-45931	primase/helicase	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	1670	1670	100%	0,0E+00	98%
55	45928-46170	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	160	160	100%	2,0E-50	94%
56	46260-46904	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	445	445	100%	1,0E-158	100%
57	47305-47469	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	113	113	100%	4,0E-32	100%
58	47492-47695	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage vB_PaeS_SCH_Ab26</i>	82,4	82,4	94%	2,0E-19	68%
59	48075-48707	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	406	406	100%	2,0E-143	92%
60	48710-49228	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	352	352	100%	4,0E-123	100%
61	49228-49656	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	291	291	100%	3,0E-100	99%
62	49653-49829	hypothetical protein	-					
63	49826-50107	hypothetical protein	<i>Roseobacter phage RDJL Phi₁</i>	76,3	76,3	91%	2,0E-16	45%
64	50100-50387	putative Znf domain-containing protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	198	198	100%	1,0E-64	100%
65	50372-50908	nucleotide triphosphate hydrolase	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	345	345	97%	3,0E-120	97%
66	50905-51327	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	277	277	100%	1,0E-94	98%

Gen	Nukleotidposition	vorhergesagte Funktion	Homologie	Max score	Total score	Ähnlichkeits-score	E-value	Identität
<i>nrdJ</i>	51709-53292	adenosylcobalamin-dependent ribonucleoside-triphosphate reductase (rtpR)	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	1089	1089	100%	0,0E+00	99%
68	53371-53832	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	320	320	100%	3,0E-111	99%
69	53832-54062	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	143	143	100%	2,0E-43	96%
<i>uvrD</i>	54155-55603	UvrD helicase (superfamily I)	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	979	979	99%	0,0E+00	99%
71	55693-56058	hypothetical protein	-					
72	56036-56197	hypothetical protein	-					
73	56194-56448	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	87	87	98%	6,0E-21	80%
74	56387-56626	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	68,6	68,6	45%	3,0E-14	97%
75	56623-57147	lytic transglycosylase	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	347	347	100%	5,0E-121	94%
76	57242-57607	holin (superfamily III)	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	244	244	100%	3,0E-82	98%
77	57585-58148	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	340	340	100%	9,0E-118	95%

Tabelle 34: Gene des Phagen JG054 mit vorhergesagter Funktion (Kap. 3.1.9.1).

Dargestellt sind die Gene mit der Sequenz, vorhergesagter Funktion und die mittels BLASTP ermittelten signifikanten Treffer (Altschul *et al.*, 1990). (-) keine signifikanten Treffer.

Gen	Nukleotidposition	vorhergesagte Funktion	Homologie	Max score	Total score	Ähnlichkeits-score	E-value	Identität
<i>terS</i>	1-447	putative terminase small subunit	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	270	270	100%	2,0E-91	90%
<i>terL</i>	444-1766	putative terminase large subunit	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	897	897	100%	0,0E+00	97%
3	1779-3314	portal protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	899	899	96%	0,0E+00	93%
4	3318-4517	putative head protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	758	758	100%	0,0E+00	90%
			<i>Pseudomonas phage MP1412</i>	278	278	99%	4,0E-87	41%
5	4575-5393	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	450	450	100%	1,0E-158	88%
6	5544-6578	major head protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	670	670	100%	0,0E+00	94%
7	6645-7157	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	273	273	100%	4,0E-92	81%
8	7230-7955	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	254	254	97%	2,0E-82	69%
9	7959-8294	structural protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	145	145	97%	2,0E-43	78%
10	8294-8806	structural protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	327	327	100%	3,0E-113	95%
11	8811-9194	structural protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	248	248	100%	3,0E-83	98%
12	9191-9601	tail terminator protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	263	263	100%	7,0E-89	94%
13	9606-11135	major tail protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	998	998	100%	0,0E+00	97%
14	11194-11613	structural protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	284	284	100%	3,0E-97	99%
15	11742-11966	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	150	150	100%	3,0E-46	96%
16	11966-12394	structural protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	276	276	100%	7,0E-94	96%
17	12394-15324	tail tape measure protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	1835	1835	100%	0,0E+00	95%
18	15336-16865	structural protein	<i>Pseudomonas phage PaMx74</i>	796	796	99%	0,0E+00	78%
			<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	566	566	100%	0,0E+00	54%
19	16875-17876	structural protein	<i>Pseudomonas phage PaMx74</i>	543	543	100%	0,0E+00	77%
			<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	442	442	99%	1,0E-153	65%
20	17878-18999	structural protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	533	533	97%	0,0E+00	72%
21	18996-19565	structural protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	320	320	100%	6,0E-105	77%

Gen	Nukleotidposition	vorhergesagte Funktion	Homologie	Max score	Total score	Ähnlichkeits-score	E-value	Identität
22	19562-20371	structural protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	509	509	100%	0,0E+00	93%
23	20381-20614	structural protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	155	155	100%	2,0E-48	100%
24	20611-20814	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	119	119	88%	2,0E-34	98%
25	20801-22978	structural protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	1352	1352	98%	0,0E+00	93%
26	22978-23334	putative structural protein	<i>Pseudomonas phage AAT-1</i>	216	216	100%	5,0E-71	88%
27	23288-23713	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	244	244	84%	1,0E-81	98%
28	23685-23981	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	142	142	100%	2,0E-43	97%
28	23691-23714		-					
29	23954-24232	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	187	187	100%	2,0E-60	98%
<i>polB</i>	24419-26599	putative DNA polymerase B	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	1390	1390	99%	0,0E+00	91%
31	26650-27603	putative DNA polymerase III beta subunit	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	582	582	100%	0,0E+00	87%
32	27603-28541	putative tRNA ribosyltransferase	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	637	637	100%	0,0E+00	96%
33	28600-29493	putative GTP cyclohydrolase	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	364	364	64%	1,0E-125	91%
34	29503-29925	putative queuosine biosynthesis protein QueD	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	290	290	100%	1,0E-99	98%
35	29930-31330	putative queuosine biosynthesis protein QueC	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	932	932	100%	0,0E+00	95%
36	31334-32041	putative queuosine biosynthesis protein QueE	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	414	414	100%	2,0E-145	82%
37	32137-32664	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	211	211	97%	3,0E-67	95%
38	32763-33503	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	202	202	100%	5,0E-62	48%
39	33503-33679	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	47,8	47,8	81%	4,0E-06	51%
40	33727-34236	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	252	252	99%	1,0E-83	76%
41	34383-36161	putative superfamily II DNA helicase	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	1140	1140	100%	0,0E+00	91%
<i>recB</i>	36158-37090	putative exonuclease RecB	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	630	630	100%	0,0E+00	96%
43	37380-38195	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	311	311	60%	1,0E-105	90%

Gen	Nukleotidposition	vorhergesagte Funktion	Homologie	Max score	Total score	Ähnlichkeits-score	E-value	Identität
<i>recA</i>	38200-38925	RecA ATPase	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	476	476	100%	6,0E-170	95%
45	38925-39815	putative DNA topoisomerase	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	578	578	100%	0,0E+00	93%
46	39812-39967	hypothetical protein	<i>Escherichia phage ECML-117</i>	41,6	41,6	68%	1,0E-03	51%
47	39964-40866	putative DNA ligase	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	556	556	100%	0,0E+00	90%
48	40868-41608	putative thymidylate synthase	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	508	508	100%	0,0E+00	98%
49	41605-41964	putative ribonuclease h like protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	205	205	98%	3,0E-66	87%
50	42050-42505	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	271	271	100%	1,0E-91	85%
51	42514-42993	deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	<i>Escherichia phage Seurat</i>	173	173	98%	3,0E-52	54%
			<i>Erwinia phage vB_EamM-Y2; Escherichia phage slur01</i>	173	173	93%	4,0E-52	58%
			<i>Enterobacteria phage CAjan</i>	170	170	92%	1,0E-50	57%
52	43087-45537	putative primase/helicase	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	1565	1565	100%	0,0E+00	90%
53	45534-45797	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	147	147	89%	7,0E-45	88%
54	45885-46538	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	352	352	100%	1,0E-121	78%
55	46938-47240	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	175	175	100%	2,0E-55	95%
56	47296-47499	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage vB_PaeS_SCH_Ab26</i>	82,4	82,4	94%	2,0E-19	68%
57	47881-48396	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	226	226	71%	3,0E-73	88%
58	48396-48932	hypothetical protein	-					
59	48980-49261	hypothetical protein	<i>Roseobacter phage RDJL Phi 1</i>	76,6	76,6	91%	1,0E-16	47%
60	49254-49541	putative Znf domain-containing protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	194	194	100%	5,0E-63	97%
61	49526-50059	putative nucleotide triphosphate hydrolase	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	338	338	97%	1,0E-117	94%
62	50056-50478	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	272	272	100%	1,0E-92	97%
<i>nrdJ</i>	50543-52438	adenosylcobalamin-dependent ribonucleoside-triphosphate reductase (rtpR)	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	1224	1224	100%	0,0E+00	92%

Gen	Nukleotidposition	vorhergesagte Funktion	Homologie	Max score	Total score	Ähnlichkeits-score	E-value	Identität
64	52516-52977	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	320	320	100%	3,0E-111	99%
65	52977-53207	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	143	143	100%	2,0E-43	96%
<i>uvrD</i>	53291-54814	putative UvrD helicase (superfamily I)	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	799	799	94%	0,0E+00	80%
67	54906-55271	hypothetical protein	-					
68	55249-55410	hypothetical protein	-					
69	55407-55670	hypothetical protein	<i>Bacillus phage Pavlov</i>	33,5	33,5	83%	6,0E+00	34%
70	55667-55921	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	89,7	89,7	100%	5,0E-22	77%
71	55988-56098	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	38,5	38,5	72%	5,0E-03	69%
72	56111-56635	putative lytic transglycosylase	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	315	315	100%	2,0E-108	83%
73	56803-57087	putative holin (superfamily III)	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	173	173	100%	1,0E-54	92%
			<i>Burkholderia phage Bcep1</i>	70,5	70,5	82%	8,0E-14	49%
74	57065-57628	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PaMx25</i>	278	278	98%	1,0E-93	79%

Tabelle 35: Gene des Phagen JG057 mit vorhergesagter Funktion (Kap. 3.1.9.2).

Dargestellt sind die Gene mit der Sequenz, vorhergesagter Funktion und die mittels BLASTP ermittelten signifikanten Treffer (Altschul et al., 1990). (-) keine signifikanten Treffer.

Gen	Nukleotidposition	vorhergesagte Funktion	Homologie	Max score	Total score	Ähnlichkeits-score	E-value	Identität
1	103-1500	hypothetical protein	-					
2	1500-2402	putative DNA replication protein O	<i>Pseudomonas phage vB_PaeP_Tr60_Ab31</i>	199	199	48%	2,0E-59	66%
3	2473-2652	hypothetical protein	<i>Enterobacteria phage hK544</i>	105	105	84%	4,0E-23	30%
4	2672-2860	hypothetical protein	-					
5	2874-3053	hypothetical protein	-					
6	3154-3864	hypothetical protein	-					
7	4192-4329	hypothetical protein	-					
8	4507-4689	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage vB_PaeP_Tr60_Ab31</i>	125	125	100%	1,0E-36	100%
9	5035-5472	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage vB_PaeP_Tr60_Ab31</i>	299	299	100%	5,0E-103	100%
10	5507-5884	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage JBD44</i>	294	294	100%	4,0E-101	99%
			<i>Pseudoalteromonas phage B8b</i>	43,5	43,5	45%	1,0E-02	32%
			<i>Pseudomonas phage YMC11/02/R656</i>	35,4	35,4	46%	5,6E+00	33%
			<i>Bacillus phage Grass</i>	122	122	98%	1,0E-33	46%
			<i>Bacillus phage Juglone</i>	120	120	92%	1,0E-32	51%
			<i>Bacillus phage B4</i>	119	119	92%	2,0E-32	54%
11	6283-6723	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage JBD44</i>	211	211	69%	1,0E-68	96%
			<i>Caulobacter phage Sansa</i>	42,4	42,4	36%	1,5E-02	43%
			<i>Vibrio phage 1</i>	36,2	36,2	34%	5,8E+00	41%
12	6732-7097	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage JBD44</i>	233	233	100%	8,0E-78	91%
			<i>Pseudomonas phage PAJU2</i>	214	214	98%	2,0E-70	88%

Gen	Nukleotidposition	vorhergesagte Funktion	Homologie	Max score	Total score	Ähnlichkeits-score	E-value	Identität
13	7094-7207	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PMG1</i> <i>Pseudomonas phage vB_PaeP_Tr60_Ab31</i> <i>Pseudomonas phage YMC11/02/R656</i> <i>Pseudomonas phage vB_PaeP_Tr60_Ab31</i> <i>Pseudomonas phage YMC11/02/R656</i>	66,2 53,1 49,3 83,2 72,8	66,2 53,1 49,3 83,2 72,8	100% 100% 100% 100% 90%	5,0E-14 9,0E-09 3,0E-07 1,0E-20 2,0E-16	95% 73% 68% 100% 95%
14	7204-7332	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PAJU2</i> <i>Pseudomonas phage PAJU2</i> <i>Pseudomonas phage D3</i> <i>Pseudomonas phage YMC11/02/R656</i> <i>Pseudomonas phage vB_PaeP_Tr60_Ab31</i>	71,2 652 568 515 497	71,2 652 568 515 497	90% 100% 100% 100% 100%	7,0E-16 0,0E+00 0,0E+00 0,0E+00 2,0E-174	92% 97% 94% 86% 93%
15	7375-8439	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PS-1</i> <i>Pseudomonas phage YMC11/02/R656</i> <i>Pseudomonas phage vB_PaeP_Tr60_Ab31</i>	399 363 362	399 363 362	99% 99% 99%	3,0E-139 2,0E-126 7,0E-126	79% 81% 81%
16	8450-9193	recombination protein Bet	<i>Pseudomonas phage PS-1</i> <i>Pseudomonas phage YMC11/02/R656</i> <i>Pseudomonas phage vB_PaeP_Tr60_Ab31</i>	399 363 362	399 363 362	99% 99% 99%	3,0E-139 2,0E-126 7,0E-126	79% 81% 81%
17	9177-9803	putative exonuclease	<i>Pseudomonas phage PS-1</i> <i>Pseudomonas phage YMC11/02/R656</i> <i>Pseudomonas phage vB_PaeP_Tr60_Ab31</i>	319 130 90,5	319 130 90,5	100% 62% 57%	5,0E-109 3,0E-36 4,0E-20	76% 52% 46%
18	9800-10324	putative homing endonucleas	<i>Xanthomonas citri phage CP2</i> <i>Citrobacter phage SH1</i> <i>Erwinia phage FE44</i> <i>Citrobacter phage CR44b</i> <i>Cronobacter phage vB_CsaP_Ss1</i> <i>Pseudomonas phage PAE1</i> <i>Erwinia phage vB_EamM_Special G</i>	130 90,5 89 58,9 84,7 82,4 82,4	130 90,5 89 58,9 84,7 82,4 82,4	62% 57% 45% 52% 48% 46% 52%	3,0E-36 4,0E-20 8,0E-20 2,0E-18 6,0E-18 6,0E-17 1,0E-16	52% 46% 50% 49% 50% 48% 44%
19	10305-10766	hypothetical protein	-					

Gen	Nukleotidposition	vorhergesagte Funktion	Homologie	Max score	Total score	Ähnlichkeits-score	E-value	Identität
20	10830-11420	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage</i> YMC11/02/R656	405	405	100%	4,0E-143	98%
21	11410-11595	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage</i> vB_PaeP_Tr60_Ab31	124	124	100%	4,0E-36	97%
22	11592-11747	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage</i> YMC11/02/R656	121	121	100%	4,0E-35	92%
23	11744-13600	hypothetical protein	-					
			<i>Pseudomonas phage</i> vB_PaeP_Tr60_Ab31	464	464	37%	9,0E-159	98%
			<i>Pseudomonas phage</i> vB_PaeP_Tr60_Ab31	327	327	26%	5,0E-102	99%
			<i>Pseudomonas phage</i> YMC11/02/R656	299	299	77%	1,0E-92	44%
24	13600-13872	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage</i> D3	179	179	100%	3,0E-57	97%
			<i>Vibrio phage</i> ICP1	45,1	45,1	95%	3,0E-04	33%
			<i>Vibrio phage</i> ICP1_2001_A	45,1	45,1	95%	3,0E-04	33%
25	13876-14199	hypothetical protein	-					
26	141925-14434	hypothetical protein	-					
27	14578-14727	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage</i> vB_PaeP_Tr60_Ab31	87,8	87,8	100%	3,0E-22	88%
			<i>Pseudomonas phage</i> D3	79	79	100%	1,0E-18	82%
			<i>Pseudomonas phage</i> YMC/01/01/P52_PAE_BP	77,4	77,4	100%	4,0E-18	78%

Gen	Nukleotidposition	vorhergesagte Funktion	Homologie	Max score	Total score	Ähnlichkeits-score	E-value	Identität
28	14712-15020	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage D3</i> <i>Pseudomonas phage</i> <i>YMC11/02/R656</i>	141	141	100%	9,0E-42	67%
			<i>Pseudomonas phage PAK_P5</i>	136	136	95%	5,0E-40	69%
			<i>Pseudomonas phage PAK_P3</i>	127	127	100%	2,0E-36	62%
			<i>Pseudomonas phage PAJU2</i>	125	125	96%	2,0E-35	62%
			<i>Pseudomonas phage</i> <i>YMC/01/01/P52_PAE_BP</i>	43,5	43,5	96%	2,0E-03	35%
29	15020-15430	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage D3</i> <i>Pseudomonas phage SM1</i>	103	103	64%	2,0E-25	65%
			<i>Pseudomonas phage D3</i>	81,3	81,3	82%	2,0E-16	41%
			<i>Pseudomonas phage D3</i>	56,6	56,6	44%	5,0E-08	52%
30	15427-15978	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage KPP10</i> <i>Pseudomonas phage</i> <i>vB_PaeM_PS24</i>	179	179	51%	1,0E-53	90%
			<i>Pseudomonas phage</i> <i>vB_PaeP_Tr60_Ab31</i>	141	141	88%	6,0E-39	51%
			<i>Pseudomonas phage JBD44</i> <i>Pseudomonas phage</i> <i>YMC/01/01/P52_PAE_BP</i>	140	140	88%	3,0E-38	51%
31	15975-16373	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage</i> <i>vB_PaeP_Tr60_Ab31</i>	157	157	96%	1,0E-47	70%
32	16370-16717	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage JBD44</i> <i>Pseudomonas phage</i> <i>YMC/01/01/P52_PAE_BP</i>	155	155	68%	1,0E-46	94%
			<i>Pseudomonas phage</i> <i>vB_PaeP_Tr60_Ab31</i>	142	142	74%	2,0E-41	77%
33	16706-19087	putative tail fibre protein	<i>Pseudomonas phage</i> <i>vB_PaeP_Tr60_Ab31</i>	1293	1293	98%	0,0E+00	82%
			<i>Pseudomonas phage JBD44</i> <i>Pseudomonas phage AF</i>	751	751	76%	0,0E+00	60%
			<i>Pseudomonas phage</i> <i>vB_PaeP_Tr60_Ab31</i>	164	164	28%	9,0E-39	42%
34	19123-21699	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage</i> <i>vB_PaeP_Tr60_Ab31</i>	1700	1700	100%	0,0E+00	98%
35	21699-23438	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage</i> <i>vB_PaeP_Tr60_Ab31</i>	1112	1112	100%	0,0E+00	98%
36	23435-25534	putative structural lysozyme	<i>Pseudomonas phage</i> <i>vB_PaeP_Tr60_Ab31</i> <i>Pseudomonas phage AF</i>	1385	1385	100%	0,0E+00	98%
			<i>Pseudomonas phage AF</i>	140	140	36%	2,0E-31	33%

Gen	Nukleotidposition	vorhergesagte Funktion	Homologie	Max score	Total score	Ähnlichkeits-score	E-value	Identität
37	25534-25998	putative internal virion protein B	<i>Pseudomonas phage AF</i>	52,8	52,8	70%	9,0E-06	35%
38	25983-26462	putative internal virion protein A	<i>Pseudomonas phage vB_PaeP_Tr60_Ab31</i>	312	312	100%	1,0E-107	96%
39	26443-28782	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage AF</i>	96,3	96,3	91%	1,0E-22	39%
			<i>Pseudomonas phage AF</i>	633	633	99%	0,0E+00	44%
			<i>uncultured Mediterranean phage uvMED</i>	572	572	99%	0,0E+00	40%
40	28779-29408	hypothetical protein	-					
41	29454-29627	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage vB_PaeP_Tr60_Ab31</i>	115	115	100%	3,0E-33	100%
42	29638-30096	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage vB_PaeP_Tr60_Ab31</i>	300	300	100%	3,0E-103	98%
			<i>Pseudomonas phage AF</i>	179	179	98%	3,0E-55	64%
43	30107-31111	putative major capsid protein	<i>Pseudomonas phage AF</i>	512	512	100%	0,0E+00	75%
			<i>uncultured Mediterranean phage uvMED</i>	325	325	99%	3,0E-107	50%
44	31124-31747	putative endoprotease	<i>Pseudomonas phage vB_PaeP_Tr60_Ab31</i>	415	415	100%	6,0E-147	99%
45	31744-32055	hypothetical protein	<i>Sodalis phage phiSG1</i>	102	102	83%	5,0E-22	40%
46	32056-33744	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage vB_PaeP_Tr60_Ab31</i>	193	193	100%	1,0E-62	90%
47	33747-33929	hypothetical protein	<i>Enterobacteria phage epsilon15</i>	379	379	100%	6,0E-122	38%
48	33931-34185	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage vB_PaeP_Tr60_Ab31</i>	163	163	100%	4,0E-51	98%
terL	34197-35660	terminase large subunit	<i>Sodalis phage phiSG1</i>	549	549	93%	0,0E+00	58%
			<i>Ralstonia phage RSK1</i>	461	461	88%	5,0E-156	53%
50	35620-36255	hypothetical protein	-					
51	36259-36489	hypothetical protein	-					

Gen	Nukleotidposition	vorhergesagte Funktion	Homologie	Max score	Total score	Ähnlichkeits-score	E-value	Identität
52	36486-36938	putative lysis protein	<i>Pseudomonas phage vB_PaeP_Tr60_Ab31</i>	285	285	98%	1,0E-97	97%
53	36922-37098	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage F10</i> <i>Pseudomonas phage vB_PaeP_Tr60_Ab31</i>	96,7	96,7	85%	7,0E-23	44%
54	37196-37399	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PAJU2</i>	107	107	100%	9,0E-30	93%
55	37380-37598	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage LPB1</i> <i>Pseudomonas phage vB_PaeP_Tr60_Ab31</i>	106	106	100%	2,0E-29	93%
56	37600-38040	putative endolysin	<i>Pseudomonas phage JD024</i>	139	139	100%	1,0E-41	100%
57	38037-38354	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage JBD26</i>	148	148	98%	2,0E-45	99%
58	38947-39519	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage JBD24</i>	100	100	94%	1,0E-26	72%
59	39516-40652	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage PAJU2</i>	97,8	97,8	93%	2,0E-25	72%
60	40652-40936	hypothetical protein	<i>Pseudomonas phage D3</i> <i>Pseudomonas phage PMG1</i> <i>Enterobacteria phage J8-65</i> <i>Escherichia phage ECBP5</i> <i>Yersinia phage PY100</i> <i>Klebsiella phage vB_Kp2</i> <i>Klebsiella phage F19</i> <i>Klebsiella phage vB_KpnP_SU503</i>	95,9	95,5	93%	9,0E-25	70%
61	40936-41319	hypothetical protein	<i>uncultured Mediterranean phage uvMED</i> <i>Salmonella phage bp63</i> <i>Vibrio phage VpKK5</i>	139	139	95%	1,0E-39	50%
62	41316-41531	hypothetical protein	-	116	116	98%	1,0E-29	37%
			-	116	116	98%	2,0E-29	37%
			-	407	407	97%	2,0E-138	52%
			-	404	404	94%	4,0E-137	52%
			-	379	379	98%	5,0E-127	46%
			-	73,2	73,2	77%	2,0E-14	49%
			-	71,6	71,6	85%	6,0E-14	47%
			-	71,6	71,6	72%	6,0E-14	53%
			-	61,6	61,6	93%	1,0E-09	32%
			-	55,5	55,5	82%	2,0E-07	33%
			-	53,1	53,1	54%	2,0E-06	44%

Gen	Nukleotidposition	vorhergesagte Funktion	Homologie	Max score	Total score	Ähnlichkeits-score	E-value	Identität
63	41528-41749	hypothetical protein	-					
64	41746-41949	hypothetical protein	-					
65	41946-42035	hypothetical protein	-					
66	42032-42925	putative hNH endonuclease	Rhizobium phage 16-3 Bacillus phage BCP8-2 uncultured Mediterranean phage uvMED	77,8 53,9 0,52	77,8 53,9 52	31% 60% 32%	2,0E-13 3,0E-05 1,0E-04	39% 26% 32%
67	42922-43224	hypothetical protein	Vibrio phage VvAW1	82,4	82,4	98%	1,0E-18	41%
68	43221-43484	hypothetical protein	Pseudomonas phage YMC11/02/R656	174	174	100%	2,0E-55	95%
69	43481-43897	putative NinB protein	Pseudomonas phage PAJU2 Pseudomonas phage vB_PaeP_Tr60_Ab31 Pseudomonas phage YMC11/02/R656	59,7 282 277	59,7 282 277	96% 100% 100%	4,0E-10 1,0E-96 1,0E-94	41% 99% 95%
70	43897-44421	putative hNH endonuclease	Pseudomonas phage vB_PaeP_Tr60_Ab31 Pseudomonas phage PS-1 Achromobacter phage JWDelta Idiomarinaceae phage 1N2-2	360 140 114 114	360 140 114 114	100% 91% 93% 93%	5,0E-126 2,0E-38 3,0E-29 4,0E-29	100% 46% 39% 42%
71	44414-44629	hypothetical protein	Pseudomonas phage vB_PaeP_Tr60_Ab31	139	139	100%	3,0E-42	94%
72	44622-44801	hypothetical protein	Pseudomonas phage PAJU2 -	129	129	100%	3,0E-38	87%

